

Aus dem Biomedizinischen Forschungszentrum, Institut für Virologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



# **RT-PCR Diagnostik von nosokomial übertragbaren Hämorrhagische-Fieber Viren**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin (Dr. med.)  
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von:

Jos Tilmann Wolf Gebhard  
aus Ehringshausen

Marburg, 2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Januar 2004 bis Mai 2006 am Institut für Virologie unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk durchgeführt.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am: 14.05.2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Herr Prof. Dr. Stephan Becker

Korreferent: Herr PD Dr. Thomas Stief



## **Abstract**

Haemorrhagic fevers are caused by a wide range of viruses. Some of them are known to spread easily by person to person contact and are able to cause nosocomial infections with high fatality rates. This applies especially to arenaviruses (Lassa fever and more exceptionally the Junin and Machupo virus), a bunyavirus (Crimean-Congo haemorrhagic fever) and the Filoviridae (Ebola and Marburg viruses). Because these diseases occur initially with non-specific influenza-like symptoms like fever, headache, myalgia etc. clinical diagnosis can be difficult. Therefore a quick, sensitive and specific diagnostic method is needed to confirm or rule out infection. Since the viruses are endemic in developing countries the method should also be as cheap as possible. The Reverse-Transcription PCR combines these characteristics best.

In this thesis RT-PCR protocols were developed that were used to detect all viruses mentioned above in one single run (except Ebola-bundibugyo which was discovered after the practical part). An internal control was implemented to minimize the risk of false-negative results.

# Inhaltsverzeichnis

Abstract .....	I
Inhaltsverzeichnis .....	II
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>2</b>
1.1 Allgemein .....	2
1.2 Lassa-Virus .....	7
1.2.1 Allgemeines .....	7
1.2.2 Virologie.....	7
1.2.3 Epidemiologie .....	8
1.2.4 Klinik und Letalität .....	10
1.2.5 Diagnose .....	12
1.2.6 Behandlung.....	12
1.2.7 Prophylaxe .....	14
1.3 Marburg- und Ebola-Virus.....	15
1.3.1 Epidemiologie .....	15
1.3.1.1 Marburg-Virus.....	15
1.3.1.2 Ebola-Virus .....	16
1.3.2 Virologie.....	19
1.3.3 Reservoir .....	20
1.3.4 Virale Proteine .....	21
1.3.4.1 Oberflächenglykoprotein (GP) .....	21
1.3.4.2 Matrixproteine (VP40, VP24) .....	22
1.3.4.3 Nukleoproteine (NP, VP30) .....	22
1.3.4.4 Polymerase (L).....	23
1.3.4.5 VP35 .....	23
1.3.5 Infektion, Replikation .....	23
1.3.6 Pathologie, Pathogenese und Immunologie.....	24
1.3.7 Klinik .....	26
1.3.8 Diagnostik und klinische Parameter .....	29
1.3.9 Therapie & Prophylaxe .....	30
1.4 Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber Virus (CCHFV).....	32
1.4.1 Allgemeines .....	32

1.4.2	Epidemiologie .....	32
1.4.3	Virologie.....	34
1.4.4	Klinik und Pathologie .....	35
1.4.5	Diagnostik und klinische Parameter .....	37
1.4.6	Therapie & Prophylaxe .....	38
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung .....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>41</b>
3.1	Chemikalien.....	41
3.2	Geräte .....	41
3.3	Kits.....	42
3.4	Oligonukleotide .....	43
3.5	Sonden.....	44
3.6	Vektoren.....	45
3.7	Restriktionsendonukleasen .....	46
3.8	Bakterien .....	46
3.9	Medien und Zusätze für die Bakterienkultur .....	46
3.10	Puffer für Agarosegelelektrophorese .....	46
3.11	DNS-Marker.....	47
<b>4</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>48</b>
4.1	Molekularbiologische Methoden .....	48
4.1.1	Amplifikation der gewünschten DNS-Segmente mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) 48	
4.1.2	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	48
4.1.3	Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese .....	49
4.1.4	Elution von DNS aus Agarosegelen .....	50
4.2	Isolierung und Quantifizierung von Plasmid-DNS aus Bakterien.....	51
4.2.1	Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNS .....	51
4.2.2	Isolierung großer Mengen Plasmid-DNS.....	51
4.3	Positives Kontrollmaterial .....	54
4.3.1	Gewinnung viraler RNS aus Serum unter Verwendung des QIAamp Viral RNA Mini Kit ....	54
4.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNS-Lösungen .....	55
4.5	Quantifizierung von RNS im LightCycler mit RiboGreen® RNA Quantitation Kit .....	56

4.6	Restriktion von DNS.....	58
4.7	Phenolextraktion und Ethanolfällung von DNS und RNS.....	59
4.8	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	60
4.9	Transformation .....	61
4.10	Ligation von PCR-Produkten mit TOPO TA Cloning-Kit .....	62
4.11	In vitro Transkription .....	63
4.12	RT-PCR .....	64
4.12.1	Einstellen der Oligonukleotidkonzentrationen.....	65
4.12.1.1	Random Decamers .....	65
4.12.1.2	Herstellung des Oligonukleotidgemisches für den internen Standard .....	65
4.12.1.3	Einstellen der virusspezifischen Oligonukleotide.....	65
4.12.2	RT-PCR auf dem GeneAmp 2700 .....	66
4.12.3	Real-Time PCR auf dem Roche Light-Cycler.....	67
4.12.3.1	PCR mit Plasmid-DNS auf dem LightCycler™ .....	69
4.12.4	Quantitative Marburg-Virus-RT-PCR auf dem LightCycler™ mit QuantiTect SYBR Green RT-PCR, Qiagen.....	69
4.12.5	Filoviren Real-Time RT-PCR mit Sonden (Panning et al., 2007) .....	70
4.12.6	Ansatz zum Vergleich der Lassa Virus GPC-Gen RT-PCR.....	72
4.13	Enzymatische Sequenzierung von DNS.....	74
4.14	Vermeidung von Kontaminationen.....	75
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>76</b>
5.1	Etablierung einer RT-PCR für Lassa-Viren mit interner Kontrolle .....	76
5.2	Etablierung einer RT-PCR für Marburg- und Ebola-Viren mit interner Kontrolle.....	78
5.2.1	Oligonukleotiddesign für Filoviren .....	78
5.3	Etablierung einer RT-PCR für Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber Virus mit interner Kontrolle .....	85
5.4	Quantitative „real-time“ Diagnostik auf dem Roche™ LightCycler® .....	86
5.4.1	Quantitative Lassa-Virus-RT-PCR auf dem LightCycler® .....	87
5.4.2	Quantitative Ebola-Virus-RT-PCR auf dem LightCycler® .....	88
5.4.3	Quantitative Marburg-Virus-RT-PCR auf dem LightCycler® .....	89
5.4.4	Ansätze zur Optimierung der Filovirusdiagnostik auf dem LightCycler® .....	90
5.4.5	Vergleich der Oligonukleotidpaare FiloA / B und Filohin / rück .....	92
5.4.6	Vergleich mit weiteren Protokollen.....	93
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>96</b>

<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>101</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>102</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>113</b>
	<b>Liste der Hochschullehrer: .....</b>	<b>114</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>115</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>116</b>



# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Verbreitung des Lassa-Fieber in West Afrika.	9
	(aus BMJ. 2003 November 29; 327(7426): 1271–1275.)	9
Abb. 2	Antigen und Antikörper-Antwort bei Ebola-HF Überlebenden im zeitlichen Verlauf angegeben in Tagen 1995-1997. Aus Rowe AK et al., 1999	29
Abb. 3	Aufbau des Vektors pGEM®-3Zf(+) laut Hersteller	45
Abb. 4	Aufbau des Vectors pCR®2.1-Topo laut Hersteller	45
Abb. 5	Nachweis von Lassa-Virus RNS mittels RT-PCR.	76
Abb. 6	Nachweis Lassa-Virus RNS + 18S-RNS mittels Multiplex-RT-PCR	77
Abb. 7	Nachweis Ebola-L RNS mittels RT-PCR	84
Abb. 8	Nachweis Marburg-L RNS mittels RT-PCR	84
Abb. 9	Nachweis Ebola-L RNS + 18S-RNS mittels Multiplex-RT-PCR	84
Abb. 10	Nachweis Marburg-L RNS + 18S-RNS mittels Multiplex-RT-PCR	85
Abb. 11	Nachweis CCHFV-NP RNS mittels RT-PCR	85
Abb. 12	Nachweis CCHF-NP RNS + 18S-RNS mittels Multiplex-RT-PCR	86
Abb. 13	Nachweis Lassa-RNS mit dem LightCycler	87
Abb. 14	Schmelzkurve Lassa-GP mit dem LightCycler	87
Abb. 15	Nachweis Ebola-RNS mit dem LightCycler	88
Abb. 16	Schmelzkurve Ebola-L	88
Abb. 17	Nachweis Marburg-L RNS mit dem LightCycler	89
Abb. 18	Schmelzkurve Marburg-L	90
Abb. 19	Nachweis Marburg-L DNS mit dem LightCycler	90
Abb. 20	Schmelzkurve Marburg-L	91
Abb. 21	Nachweis Ebola-Zaire (Eckron) mit FiloA / B mittels RT-PCR	92
Abb. 22	Nachweis Ebola-Zaire (Eckron) mit Filohin / rück mittels RT-PCR	92
Abb. 23	Nachweis von Ebola-Zaire, Ebola-Sudan und Marburg-Virus	93
Abb. 24	Nachweis Ebola-Zaire-Virus-RNS mit Filohin / -rück mittels RT-PCR	94
Abb. 25	Nachweis Ebola-Sudan-Virus-RNS mit Filohin / -rück mittels RT-PCR	94
Abb. 26	Nachweis Marburg-Virus-RNS mit Filohin / -rück mittels RT-PCR	94
Abb. 27	Nachweis Lassa-GPC RNS	95

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ALT	Alaninaminotransferase
Amp; Amp <sup>r</sup>	Ampicillin; Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
aPTT	“Activated Partial Thromboplastin Time” / Aktivierte Partielle Tromboplastin Zeit
AS	Aminosäuren
AST	Aspartataminotransferase
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
BSL	“Bio Safety Level” / Biologische Sicherheitsstufe
CCHF(V)	“Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (Virus)” / Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber (Virus)
CDC	Center for Disease Control
C-terminal	Carboxyterminal
DIC	“Disseminated Intravascular Coagulation” / Disseminierte Intravasale Gerinnung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DRK	Demokratische Republik Kongo
EBOV	Ebola-Virus
ELISA	„Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay” / Enzymvermittelter Immunassay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
E <sub>x</sub>	Extinktion bei Wellenlänge x
GP	Glykoprotein
h	Stunden
HF(V)	Hämorrhagisches Fieber (Virus)
i.e.	“Immediate early” / unmittelbar früh
i.v.	intra venös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Kan; Kan <sup>r</sup>	Kanamycin; Kanamycinresistenz
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LASV	Lassa-Virus
LB	Luria-Bertani Broth
mA	Milliampere
MARV	Marburg-Virus
MBP	„Maltose-binding-protein“ / Maltose bindendes Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex / Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
MW	„Molecular Weight“ / Molekulargewicht
NaAc	Natriumacetat
Ni-NTA	Ni <sup>2+</sup> -nitrilo-tri-Essigsäure-Agarose
N-terminal	Aminoterminal
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei Wellenlänge x
OLR	Offener Leserahmen
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	„Polymerase Chain Reaktion“ / Polymerase Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RER	Raues endoplasmatisches Retikulum
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	„rotations per minute“ / Umdrehungen pro Minute
RSS	Restriktionsschnittstellensequenz
RT	Reverse Transkriptase
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U	„Units“ / Einheiten
ÜN	über Nacht
V	Volt
VT	Volumenanteil

# **1 Einleitung**

## **1.1 Allgemein**

Die Anzahl humanpathogener Viren ist ebenso vielfältig wie die von ihnen ausgelösten Krankheitsverläufe unterschiedlich sind. Die Spanne reicht, je nach Tropismus und Virulenz des Virus, von einfachen, teils klinisch unauffälligen, selbstlimitierenden Durchfall- und Erkältungskrankheiten bis hin zur vollständigen Zerstörung einzelner oder multipler Organsysteme. Die wohl eindrucksvollsten und gefürchtetsten Verläufe nehmen Infektionen, die von der Gruppe der hämorrhagischen-Fieber Viren (HFV) ausgehen.

Den Begriff „Hämorrhagisches Fieber“ (HF) prägten russische und japanische Wissenschaftler in der Zeit um 1930, als sie eine neuartige akute Fiebererkrankung mit Blutungsneigung und Nephritis beschrieben, die im Dreieck von Nordostchina, Russland und Korea um sich griff (Mayer, 1952). Erst 1976 konnte in Zellkulturen der Erreger, ein Hanta-Virus, isoliert werden (Lee, van der Groen, 1989). Seitdem wurden noch einige weitere von Viren ausgelöste Krankheiten entdeckt, die mit einer erhöhten Blutungsneigung und hohem Fieber einhergehen und entsprechend unter dieser Bezeichnung subsummiert werden. Diese Gruppe umfasst derzeit 14 Viren aus 4 verschiedenen Familien (Arena-, Filo-, Bunya-, Flaviviridae) in deren Krankheitsverlauf es zu massiven inneren und äußeren Blutungen kommen kann.

Von besonderem Interesse für Pflegepersonal und Ärzte sind die Erreger, bei denen eine Übertragung von Mensch zu Mensch möglich ist. Eine schnelle und sensitive Diagnostik kann hier Leben retten und helfen Epidemien zügig einzudämmen. Erschwert wird die Früherkennung der akut verlaufenden Infektionen durch die plötzlich einsetzenden unspezifischen Symptome zu Beginn der Erkrankung wie Fieber mit relativer Bradykardie, Myalgien, Kopfschmerzen und allgemeinem schwerem Krankheitsgefühl. Erst später kommen Anzeichen vasculärer Dysregulation und vermehrter Gefäßpermeabilität hinzu. Einige der Erreger schädigen bevorzugt die Leber, andere wiederum hauptsächlich die Nieren. Das Auftreten von Symptomen wie Schock, Enzephalopathie oder schwere

Blutungsneigung verschlechtern die Prognose. Der jeweilige Pathomechanismus, der zu der hämorrhagischen Diathese führt, ist noch Gegenstand der Forschung. Tierversuche lassen allerdings Rückschlüsse auf eine unterschiedliche Pathogenese der Hämorrhagien bei den jeweiligen Viren zu (Chen, Cosgriff, 2000 (Übersichtsartikel)).

Fast immer kommt es zu einer Thrombozytopenie, der entweder eine verminderte Produktion und/oder ein erhöhter Umsatz der Thrombozyten zugrunde liegt. Dies geschieht jedoch auch bei vielen anderen viralen Infekten und kann nicht als alleiniger Auslöser der Hämorrhagien herangezogen werden. Für die verminderten Thrombopoese kann entweder eine herabgesetzte Produktion stimulierender Mediatoren aus Stromazellen oder die Infektion der Megakaryozyten selbst ursächlich sein. Ein erhöhter Verbrauch resultiert aus gestörter Thrombozytenfunktion z.B. durch Immunkomplexablagerungen an der Oberfläche oder durch DIC (disseminated intravascular coagulation), die in besonders schwer verlaufenden Fällen auftritt. Die beinahe obligatorische Leberschädigung während eines VHF bedingt des Weiteren eine verminderte Produktion von humoralen Gerinnungsfaktoren, die in einer verlängerten aPTT, Prothrombin- und Thrombinzeit resultiert. Zudem kann häufig eine Schädigung des Gefäßepithels beobachtet werden. Diese führt einerseits zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade und der Plättchenaggregation und andererseits zur Ausbildung von Ödemen, die wegen des sich entwickelnden Volumenmangels und der resultierenden Polyglobulie die Homöostase weiter verschlechtern (Chen, Cosgriff, 2000). Eine Volumensubstitutionstherapie muss streng kontrolliert stattfinden, denn ein überschießender Einsatz von kristallinen Lösungen kann zu einer Exazerbation der Ödeme (insbesondere Lungenödem) führen, zudem muss die häufig beeinträchtigte Nierenfunktion berücksichtigt werden.

Einen weiteren Einfluss auf die Hämostase und Gefäßpermeabilität nehmen Immunmodulatoren wie Zytokine (z.B. IL-1, IL-2, IL4, IL6, IL8, TNF und Interferone) und Entzündungsmediatoren (Vaporciyan, Ward, 1995). Interessanterweise konnte bei einigen HF eine überschüssige Produktion dieser Substanzen für die entstehende Symptomatik verantwortlich gemacht werden, bei anderen hingegen lieferte eine ausbleibende oder verzögerte Immunantwort die Erklärung für schwere, hämorrhagische Verläufe (Peters, Zaki, 2002).

Bislang sind nur wenige antivirale Therapeutika bekannt oder gar Schutzimpfungen möglich, so dass fast immer nur symptomatisch behandelt werden kann. Einzelne Erfolge wurden mit frühzeitiger Gabe von Rekonvaleszentenseren (Leroy et al., 2002) und/oder dem Nukleosidanalogen Ribavirin (Lassa-, Krim-Kongo-HF Virus) beobachtet (McCormick et al., 1986 / Ergönül et al., 2004).

Entsprechend ihrer hohen Virulenz und dem Fehlen von Präventions- und Therapiemaßnahmen werden viele dieser Viren der höchsten Risikogruppe (L4) zugeordnet. Außerdem haben sie folgende gemeinsame Eigenschaften:

- Alle sind RNS-Viren
- Alle besitzen eine lipidhaltige Hülle
- Ihr natürliches Reservoir sind Säugetiere oder Insekten. Bei den Filoviren ist das Reservoir noch nicht sicher identifiziert, im Verdacht stehen Flughunde (Leroy et al., 2005).
- Hämorrhagische Fiebviren sind geographisch auf bestimmte Lebensräume der Wirte beschränkt.
- Menschen sind nicht das natürliche Reservoir dieser Viren. Erkrankungen beim Menschen treten meist sporadisch auf.

Die Erreger gehören zu den vier Virusfamilien Arenaviridae, Bunyaviridae, Filoviridae und Flaviviridae (Tabelle 1):

<b><i>Arenaviridae</i></b>	<b><i>Bunyaviridae</i></b>	<b><i>Filoviridae</i></b>	<b><i>Flaviviridae</i></b>
Lassa-Virus (LASV)	Rift-Valley-Fieber-Virus (RVFV)	Marburg-Virus (MARV)	Gelbfieber-Virus (YFV)
Junin-Virus (JUNV)	Krim-Kongo-Virus (CCHF)	Ebola-Virus (EBOV)	Dengue-Virus (DENV)
Machupo-Virus (MACV)	Hanta-Viren		Omsk-Virus (OHFV)
Guanarito-Virus (GTOV)			Kyasanur Forest Desease
Sabin-Virus (SFNV)			

***Tabelle 1 Hämorrhagische Fieber Viren, Gliederung von exemplarischen Vertretern***

Die Infektionen treten meist in Gebieten auf, die medizinisch und technisch unterversorgt sind. Sie kommen auf allen Kontinenten vor, mit Ausnahme der Antarktis. Durch den Anstieg der Reisetätigkeit und die Erschließung neuer Urlaubsziele kommt es immer wieder zum Export der lokal begrenzten Erreger in Gebiete, in denen diese Viren nicht endemisch sind (Timen et al., 2009, Haas et al, 2003).

Eine weitere Bedeutung fällt diesen Viren im Rahmen ihrer Eignung zur Herstellung biologischer Waffen zu. Dafür müssen die Erreger folgende Eigenschaften besitzen:

- Sie können über Aerosole und von Mensch zu Mensch verbreitet werden
- Sie haben eine niedrige Infektionsdosis
- Sie besitzen eine hohe Morbidität und Mortalität
- Sie verursachen Angst und Panik in der Bevölkerung und bei medizinischem Personal
- Es gibt keine Schutzimpfungen bzw. derer genügend Vorräte
- Die Erreger sind verfügbar und können im großen Maßstab gezüchtet werden

- Ihre Bekämpfung erfordert besondere Maßnahmen der Gesundheitsbehörden
- Es gab bereits Bemühungen die Erreger waffenfähig zu machen

(Borio, 2002)

Diese Voraussetzungen werden vor allem von Filoviren (Marburg-, Ebola-Virus) und Arenaviren (Lassa-Virus, „New World arenaviruses“) erfüllt.

Die Verdachtsdiagnose „hämorrhagisches Fieber“ ist dann zu stellen, wenn folgende Punkte zutreffen:

- Ein Aufenthalt des Patienten in einem Endemiegebiet liegt innerhalb der Inkubationszeit
- Die Anamnese liefert Hinweise auf den Kontakt mit einem Vektor oder einem anderen Patienten mit hämorrhagischem Fieber
- Es liegen folgende Leitsymptome vor:
  - Anhaltend hohes Fieber ( $>38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ )
  - Blutungsneigung
  - Transaminasenerhöhung
  - Ödembildung

Andere zu Hämorrhagien neigende tropische Infektionen wie *Malaria*, *Leptospirose*, *Typhus*, *Fleckfieber*, intestinaler *Milzbrand* sind ausgeschlossen. (cave: Mischinfektionen sind theoretisch möglich)

Liegt ein begründeter Verdacht vor, ist es von außerordentlicher Wichtigkeit, dass dieser Verdacht schnell durch eine hochsensitive Diagnostik bestätigt oder widerlegt werden kann. Serologische Nachweise sind nur im Einzelfall möglich, da zum einen spezifische Antikörper häufig erst im späteren Krankheitsverlauf gebildet werden und es außerdem zu Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen andere Erreger kommen kann. Zum Beweis einer akuten Infektion kann nur das spezifische IgM oder ein signifikanter Anstieg des IgG im Verlauf herangezogen werden, da die Seroprävalenz von IgG-Antikörpern der Bevölkerung in Endemiegebieten mitunter sehr hoch sein kann (Lukashevich et al., 1993).

Mit der Einführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und deren Erweiterung um den vorgeschalteten Schritt der Reversen Transkription in die medizi-



nische Routinediagnostik, ist es möglich geworden, das genomische Material der Infektionserreger schnell und spezifisch exponentiell zu vervielfältigen und nachzuweisen. Je nach verwendetem PCR-Cycler können sogar relativ präzise Rückschlüsse über die Viruslast der Probe getroffen werden und somit wird bei Mehrfachmessungen die Tendenz des Krankheitsverlaufes prognostizierbar.

## 1.2 Lassa-Virus

### 1.2.1 Allgemeines

Das Lassa-Fieber wurde erstmals 1950 dokumentiert. Der Erreger allerdings blieb bis 1969 unentdeckt. Damals wurde eine Missionskrankenschwester in Nigeria mit einer unklaren Fiebererkrankung im Krankenhaus aufgenommen und verstarb 30 Stunden später. Zwei weitere Schwestern, die sie in dieser Zeit pflegten, erkrankten ebenfalls. Eine der beiden verstarb nach 14 Tagen, die dritte Betroffene wurde zur weiteren Behandlung in die USA gebracht. Sie genas nach zwei Monaten. Als Auslöser konnte ein bisher unbekanntes Virus ausgemacht werden. Gemäß der internationalen Vereinbarung zur Nomenklatur von Viren wurde es nach dem Ort des ersten Auftretens - Lassa - benannt, die Erkrankung entsprechend Lassa-Fieber (Frame et al., 1970).

### 1.2.2 Virologie

Das Lassa-Virus gehört zur Virusfamilie der Arenaviridae (lat. *arena* = Sand), die nur den Genus Arenavirus beinhaltet. Arenaviren sind Lipid umhüllte polymorphe Viren mit einem variablen Durchmesser von 80-300 nm und besitzen zwei RNS-Segmente. Das L- („large“, ca. 7100 bp) und das S- („small“, 3421 bp) Segment, die für vier Produkte, sowohl in negativer als auch in positiver Richtung kodieren (ambisense). Die beiden Segmente liegen nicht in äquimolaren Mengen vor, das S-Segment ist grundsätzlich häufiger vorhanden. Die 5' Region des S-Segments kodiert in der negativen Richtung das Vorläuferprotein GP-C, das später proteolytisch in zwei Fragmente (GP-1 und GP-2) gespalten wird (Buchmeier et al., 1987). Außerdem kodiert das S-Segment das Nukleoprotein NP. Auf dem L-Segment liegen die genetischen Informationen für die virale RNS-abhängige RNS-Polymerase und das Z-Protein, das die entscheidende Rolle bei Freisetzung neuer viraler Partikel übernimmt (Strecker et

al., 2003). Die Lipiddoppelschicht entstammt der Plasmamembran der infizierten Zelle.

Vom Lassa-Virus sind bisher vier serologische Subtypen bekannt: Typ Nigeria, Sierra Leone, Liberia und Typ Zentralafrikanische Republik.

Das Virus ist relativ labil und bleibt bei Umgebungstemperatur einige Stunden infektiös. Erhitzen für eine Stunde auf 65 °C inaktiviert die Viren. Desinfektion kontaminierter Gegenstände und Flächen kann mit Detergentien, Oxidantien, und organischen Lösungsmitteln erfolgen (Schmitz, 2001).

### 1.2.3 **Epidemiologie**

Fast alle Arenaviren sind natürliche Parasiten von Nagetieren (Howard et al., 1980). Die einzige Ausnahme ist das Tacaribe-Virus, das in Flughunden (*Artibeus spp.*) seinen Wirt gefunden hat (Downs et al., 1963). Als bisher einziger bekannter Wirt für das Lassa-Virus konnte die Vielzitzenmaus *Mastomys natalensis* identifiziert werden. In ihr persistiert das Virus lebenslang ohne dem Tier selbst zu schaden. Blut und Urin der Mäuse weisen sehr hohe Virustiter auf. Der Mensch infiziert sich durch direkten Kontakt mit den Nagern oder deren Ausscheidungen (Staub, Aerosole). In einigen Gebieten werden die Nagetiere als Nahrungsquelle betrachtet, so dass es auch durch den Verzehr der Tiere zu Infektionen kommen kann (Ter Meulen et al. 1996). In Endemiegebieten sind bis zu 15 % der Mäusepopulation infiziert. In den Häusern von Menschen mit Lassa-Fieber finden sich 10 Mal häufiger infizierte Mäuse als in Kontrollhäusern (Keenlyside et al., 1983). Endemisch ist das Lassa-Virus in den tropischen Regionen Westafrikas, insbesondere in den Ländern Elfenbeinküste, Gambia, Ghana, Liberia, Mali, Namibia, Nigeria, Senegal, Sierra Leone und Zentralafrikanische Republik (Abb. 1). Bislang ließ sich nicht erklären, warum das Lassa-Fieber ausschließlich in West-Afrika endemisch ist, der Vektor *M. natalensis* jedoch fast auf dem ganzen Kontinent verbreitet ist (Richmond, Baglole, 2003).



**Abb. 1**      **Verbreitung des Lassa-Fieber in West Afrika.**  
 (aus BMJ. 2003 November 29; 327(7426): 1271–1275.)

Von einer saisonalen Häufung von Lassa-Fällen wurde bislang während der Trockenzeit von Januar bis April ausgegangen. Datenerhebungen aus Sierra Leone zeigen jedoch einen Anstieg während des Übergangs zur Regenzeit (Mai bis November) (Richmond und Baglole, 2003). Die Übertragung von Mensch zu Mensch ist praktisch über den Kontakt mit jeglicher Körperflüssigkeit eines Infizierten möglich, wie z.B. Blut, Erbrochenem, Rachensekret, Stuhl, Urin oder über Wundinfektion. Die Übertragung durch Samenflüssigkeit ist sogar über einen Zeitraum von 3 Monaten auch nach Genesung möglich. (WHO, 2000)

Die Seroprävalenz für Antikörper gegen das Lassa-Virus ist regional sehr unterschiedlich. So wurden z.B. in Sierra Leone und Guinea 4-55 % (Lukashevich et al., 1993) der Bevölkerung positiv getestet, in Nigeria waren es 21 % (Tomori et al., 1988).

Bei der Anzahl der geschätzten Neuerkrankungen pro Jahr (Inzidenz) divergieren die Zahlen alter und neuerer Erhebungen zum Teil erheblich. Man rechnete jährlich mit 100.000 bis 300.000 Erkrankungen bezogen auf ganz West-Afrika und 5000 Todesfällen. (McCormick et al., 1987) Eine neuere Bewertung beziffert die jährliche Inzidenz mit ca. 3 Mio. Infektionen und 67.000 Todesfällen. Hinzu kommen jährlich 3 Mio. Reinfektionen. Diese Zahlen beruhen ausschließ-

lich auf Daten aus Sierra Leone, Guinea und Nigeria und beziehen sich auf deren Population. Aus anderen Ländern, in denen Lassa-Infektionen aufgrund Seropositivität der Bevölkerung vermutet werden müssen, liegen keine verwertbaren Daten vor (Richmond und Baglolle, 2003). Eine mögliche Erklärung für die gravierenden Unterschiede könnte darin liegen, dass das Lassa-Virus lange Zeit nicht ausreichend erforscht werden konnte. Zum einen waren die Endemiegebiete teilweise von Bürgerkriegen und Unruhen betroffen, die eine konsequente Forschungsarbeit und epidemiologische Studien schwierig bzw. unmöglich machten. Zum anderen verlaufen bis zu 80 % der Infektionen mild oder gar symptomlos und entgehen der Erfassung, da diese Fälle selbstverständlich nicht hospitalisiert werden. Hinzu kommt, dass die Diagnose Lassa-Fieber in vielen Krankenhäusern Westafrikas klinisch gestellt wird, da moderne und teure Geräte zur sicheren Diagnostik wie z.B. PCR-Cycler nicht vorhanden sind.

#### 1.2.4 **Klinik und Letalität**

Die Inkubationszeit des Lassa-Fiebers beträgt 2-21 Tage. Zu Beginn sind die Symptome unspezifisch und unterscheiden sich nicht von denen einer Malaria oder eines schweren bakteriellen oder anderen viralen Infektes. Die Verdachtsdiagnose Lassa-Fieber wird meist erst nach Nichtansprechen des Fiebers auf Antimalaria- und antibakterielle Mittel gestellt.

Als die wichtigsten richtungsweisenden Symptome im Initialstadium gelten:

- hohes Fieber ( $>38^{\circ}\text{C}$ )
- schwere Pharyngitis mit Belägen auf den Tonsillen (40 %)
- retrosternale Schmerzen
- Proteinurie

(McCormick et al., 1987)

Weitere Symptome an den ersten drei Tagen der Erkrankung sind allgemeine Schwäche und Unwohlsein. Danach folgen Muskel- und Gelenkschmerzen, progrediente Halsentzündung, Übelkeit und Erbrechen, Durchfall, Kopfschmerzen, Husten, druckdolente Schwellungen der zervikalen und nuchalen Lymphknoten. Bei hellhäutigen Patienten kann gelegentlich ein makulopapulöses Exanthem beobachtet werden. Gegen Ende der ersten Krankheitswoche entwi-

ckeln sich die Organmanifestationen (Myokard, Perikard (2 %), Niere, Lunge, Leber, Gehirn, Gehörschäden (29 %) (Cummins et al. 1990)).

Die Prognose kann am besten anhand der Viruslast im Blut und der Aspartataminotransferase (gebräuchliche Abkürzungen: AST, ASAT, GOT) abgeschätzt werden – die Bildung von Antikörpern gegen das Virus scheint beim Lassafieber keine entscheidende Rolle für den Krankheitsverlauf zu spielen (Johnson et al., 1987). Hieraus lässt sich vermuten, dass die entscheidende Immunreaktion gegen das Virus zellulärer und nicht humoraler Herkunft ist.

Zu Blutungen kommt es bei weniger als einem Drittel der Patienten und kündigt eine schlechte Prognose an. Zeichen vermehrter vaskulärer Permeabilität wie Ödembildung an Hals und Gesicht sowie eine hämorrhagische Konjunktivitis sind ebenfalls als ungünstig für die Prognose zu werten. Im Gegensatz zu anderen HF lässt sich die erhöhte Kapillardurchlässigkeit und Blutungsneigung weniger auf eine Endothelschädigung der Gefäße zurückführen als auf das Vorhandensein eines Thrombozyteninhibitors, der zu einer deutlichen Reduzierung der Plättchenaggregation über klassische Auslöser wie ADP, Kollagen und Arachidonsäure führt (Chen, Cosgriff, 2000).

Im Allgemeinen entscheidet sich zwischen der zweiten und der dritten Krankheitswoche, ob der Patient stirbt oder überlebt. Letztendlich liegt die Mortalität hospitalisierter Patienten zwischen 15 % und 25 % (McCormick et al., 1987), die Gesamtmortalität aller Lassa-Erkrankungen wird auf 1-2 % geschätzt. Weit aus höher liegt die Sterblichkeit bei Schwangeren und ihren Feten. Sie beläuft sich auf annähernd 90 % bei Feten und 100 % bei Neugeborenen. Besonders hoch ist das Risiko für die Mutter, wenn die Infektion im dritten Trimenon stattfindet (30 % Mortalität verglichen mit 7 % während der ersten beiden Schwangerschaftsdrittel). Ein Schwangerschaftsabbruch steigert signifikant die Überlebenswahrscheinlichkeit für die Frauen (Price et al., 1988).

Der biologische Hintergrund dieser Beobachtung ist nicht vollständig geklärt. Jedoch deutet das Auffinden extrem hoher Viruskonzentrationen in plazentarem und fetalem Gewebe darauf hin, dass hier keine adäquate zelluläre Immunant-

wort stattfindet. Dem Fetus fehlen ausgereifte T-Zellen und die mütterlichen T-Zellen können die plazentare Infektion nicht attackieren, da Plazentazellen keine Klasse I & II MHC-Moleküle exprimieren. Der Uterus kann somit zu einem Ort besonders effizienter Virusproduktion werden (Peters, Buchmeier et al., 1996).

#### 1.2.5 **Diagnose**

Die Diagnose kann entweder durch einen direkten Nachweis des Virus oder über den Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgen. Einen direkten Virusnachweis ermöglicht die Anzucht in Zellkulturen oder in Versuchstieren wie Bymäusen oder Meerschweinchen. Dieses darf nur unter entsprechenden Sicherheitsbedingungen geschehen, die nur von Speziallaboratorien eingehalten werden können. Eine sicherere und schnellere Möglichkeit bietet die RT-PCR. Bei ihr wird eine Sequenz des S-Segmentes amplifiziert, die für das GP codiert. Bereits bei Krankenhausaufnahme lassen sich mit dieser Methode 79 % der Fälle bestätigen, nach 3 Tagen Aufenthalt 100 %. Im Vergleich dazu haben bei Aufnahme nur 53 % der Patienten IgG und 67 % IgM gebildet. Mit Immunfluoreszenz ließen sich auch drei Tage nach Aufnahme nur 52 % der Fälle verifizieren (Demby et al., 1994).

Besondere diagnostische Maßnahmen erfordern Patienten, die aus einem Endemiegebiet kommen und neben Fieber hauptsächlich zerebrale Symptome wie Desorientierung, Krämpfe, Myoklonien, Tremor und Koma aufweisen. Ein Fall wurde dokumentiert, bei dem das Virus nur im Liquor, aber nicht im Serum nachgewiesen werden konnte (PCR mit modifiziertem Rückprimer (80F2-CSF) und Anzucht in Vero-Zellkultur) (Günther et al., 2001).

#### 1.2.6 **Behandlung**

Eine kausale Behandlungsmöglichkeit gibt es beim Lassa-Fieber derzeit nicht. Es ist aber mit dem Virostatikum Ribavirin möglich, den Schweregrad der Erkrankung gering zu halten und die Sterblichkeit um bis zu 90 % zu verringern. Voraussetzung hierfür ist die frühzeitige intravenöse Gabe während der ersten sechs Krankheitstage (Richmond und Baglolle, 2003).

Ein Therapieschema für Ribavirin wird bei Vorliegen einer Lassa-Fieber-Infektion für alle Individuen (auch Kinder & schwangere Frauen) empfohlen (Tabelle 2):

- Tag 1: 1 x 30 mg/kg i.v. Initialdosis
- Tag 2-5: 16 mg/kg i.v. alle 6 h
- Tag 6-11: 8 mg/kg i.v. alle 8 h

***Tabelle 2 Therapie mit Ribavirin bei Lassa-Virus-Infektion***

Der Nutzen einer oralen Gabe von 600 mg Ribavirin alle 6 h für 7 Tage als Prophylaxe für besonders exponierte Kontaktpersonen Erkrankter ist umstritten und die Indikation sollte zurückhaltend gestellt werden. Eine engmaschige Kontrolle der Exponierten hinsichtlich ihres Befindens und zweimal tägliche Kontrolle der Körpertemperatur gilt als sinnvollere und nebenwirkungsärmere Maßnahme (Peters, Buchmeier et al., 1996).

Im Zusammenhang mit der Gabe von Rekonvaleszentenserum wurden einzelne Erfolge berichtet, diese müssen allerdings relativ hochdosiert gegeben werden. Die Hoffnung der passiven Immunisierung liegt in der Entwicklung einer standardisierten monoklonalen Antikörperrückgewinnung (Peters, Buchmeier et al., 1996).

Die verbleibenden Behandlungsmöglichkeiten beschränken sich auf die Symptome. Eine moderate Sedierung und Schmerztherapie mit langwirksamen Opiaten sollte angestrebt werden. Die Sicherung des kardiopulmonalen Kreislaufes durch adäquate Volumenzufuhr und Intubationsbereitschaft sind obligatorisch. Blutkonserven, Thrombozytenkonzentrate und Gerinnungsfaktoren zur Substitution sollten ebenfalls bereitgehalten werden. Grundsätzliche Maßnahmen bei Patienten mit hämorrhagischer Diathese sollten unbedingt eingehalten werden, wie zum Beispiel die Vermeidung von intramuskulären Injektionen und keine Gabe von gerinnungshemmenden Medikamenten wie Acetylsalicylsäure und Heparin. Beim Lassa-Fieber kann ein low-cardiac-output Syndrom entstehen, das streng überwacht werden sollte. Die rechtzeitige Anlage eines Rechtsherzkatheters (Swan-Ganz Katheter) ist erstrebenswert. (Peters, Buchmeier et al., 1996).

### 1.2.7 **Prophylaxe**

Eine Schutzimpfung gegen Lassa-Fieber gibt es bislang nicht. Es befinden sich jedoch einige Impfstoffe in der Entwicklung und im Tierversuch wurden erste Erfolge bei der Immunisierung gegen das Glykoprotein beobachtet (Geisbert et al., 2005).

Die beste Prophylaxe besteht im Vermeiden von Kontakten mit den Mäusen bzw. deren Bekämpfung innerhalb menschlicher Siedlungen. Dazu gehört auch die sichere Verwahrung von Lebensmittelvorräten (z.B. Getreidesäcke), die häufig ungeschützt und offen auf dem Boden lagern und so leicht von den auf nächtlicher Nahrungssuche umherwandernden Nagern kontaminiert werden können.

Im Krankheitsfalle müssen die Patienten schnell isoliert und das Pflegepersonal entsprechend eingewiesen werden. Kontaminiertes Patientenmaterial ist umgehend und fachgerecht zu entsorgen und bei allen Arbeiten am Patienten sind Mundschutz, Schutzbrillen, Handschuhe und Schutzkleidung unbedingt anzulegen.



## 1.3 Marburg- und Ebola-Virus

### 1.3.1 Epidemiologie

#### 1.3.1.1 Marburg-Virus

Der erste Vertreter der Familie Filoviridae, das Marburg-Virus, wurde 1967 entdeckt. Im August dieses Jahres kam es unter Laborangestellten in Marburg, Frankfurt/Main und Belgrad beinahe zeitgleich zum Ausbruch einer schweren Fiebererkrankung mit inneren Blutungen. Alle primär Betroffenen waren an der Produktionskette zur Herstellung von Zellkulturen aus Affennieren (*Cercopithecus aethiops*) beteiligt. Die Herkunft der Affen war Uganda. Sechs weitere Infektionen traten bei Personen auf, die engen Kontakt zu den Erkrankten hatten. Insgesamt waren 31 Personen betroffen, sieben davon verstarben. Es begann eine fieberhafte Suche nach dem bisher unbekannten Erreger, denn alle anderen Erreger konnten als Auslöser ausgeschlossen werden. Erst im November gelang Werner Slenczka im Institut für Virologie in Marburg die eindeutige Identifizierung des Virus, das sich sowohl mit seiner filamentösen Form als auch in den antigenen Eigenschaften von allen bisher bekannten Viren unterschied. Da auch die Affen, die das Virus mitgebracht hatten, schwere Krankheitssymptome zeigten und alle versuchsweise infizierten Affen an der Krankheit sterben, scheiden diese Primaten als natürliches Reservoir aus. Eine Zusammenfassung der bisherigen Marburg-Virus Epidemien ist in Tabelle 3 gezeigt.

<b>Jahr</b>	<b>Land</b>	<b>Vermutete Herkunft</b>	<b>Infektionen des Menschen</b>	<b>Mortalität in Prozent</b>
1967	Deutschland und Jugoslawien	Uganda	32	21
1975	Südafrika	Zimbabwe	3	33
1980	Kenia	Kenia	2	50
1987	Kenia	Kenia	1	100
1998-2000	Demokratische Republik Kongo	Durba, DRK	154	83
2004-05	Angola	Uige-Provinz	WHO: 374 CDC: 252	88 90
2007	Uganda	Kamwenge District	2	50
2008	Niederlande	Uganda	1	100

**Tabelle 3 Marburg-Virus - Epidemien und Mortalität**

### **1.3.1.2 Ebola-Virus**

Im Juni und September des Jahres 1976 kam es an zwei weit voneinander entfernten Orten in Zaire und dem Sudan zu Ausbrüchen eines äußerst schwer verlaufenden hämorrhagischen Fiebers. Als Erreger konnte ein Virus identifiziert werden, das morphologisch sehr dem Marburg-Virus ähnelte, aber keine serologische Kreuzreaktivität mit diesem aufwies. Es wurde nach einem kleinen Fluss in der Nähe des Missionskrankenhauses, in dem die ersten Fälle auftraten, benannt: Ebola (Johnson et al. 1977). Mittlerweile sind fünf Subtypen des Virus entdeckt worden, von denen einer (Reston) nicht humanpathogen zu sein scheint, dafür aber bei Affen ein in hohem Maße tödliches hämorrhagisches Fieber verursacht (Jahrling et al., 1990).

Der Ausbruch in Zaire (heute Demokratische Republik Kongo) umfasste 318 Personen, die Mortalitätsrate wurde auf 88 % geschätzt. Im Sudan infizierte das Virus 284 Menschen von denen 53 % die Krankheit nicht überlebten. Beide Male waren auch viele Ärzte und Krankenschwestern betroffen, da sie, sich der Gefahr nicht bewusst, grundlegende hygienische Maßnahmen nicht einhielten und so sich selbst und andere Patienten infizierten. In beiden Fällen kam es

durch engen persönlichen Kontakt mit den Erkrankten und die Wiederverwendung von Nadeln und Spritzen zur Verbreitung der Krankheit.

In den 80er Jahren kam es zu keinem weiteren Auftreten des gefürchteten Erregers, bis 1989 in den USA ein Massensterben unter Affen beobachtet wurde, die kürzlich von den Philippinen importiert worden waren. Bei der Suche nach der Ursache fand man einen neuen Vertreter der Filoviren, den man als Ebola-Subtyp einordnen konnte. Ebola-Reston erwies sich als hoch pathogen im Tierversuch mit Affen, die das typische Krankheitsbild eines von Filoviren verursachten HF entwickelten (Hayes et al., 1992). Im Oktober 2008 wurde auf den Philippinen in Schweinen Antikörper gegen das Ebola-Reston Virus gefunden. Anlass zur Untersuchung war ein Ausbruch des in Asien verbreiteten „Porcine reproductive and respiratory syndrome“ (PRRS) mit besonders hoher Mortalität. Es bleibt unklar, ob es einen pathogenetischen Zusammenhang gibt oder sich um einen Zufallsbefund handelt (Barrete et al., 2009).

Serologische Untersuchungen bei Personen, die mit den infizierten Tieren in Kontakt gekommen waren, offenbarten subklinische Infektionen. Sie hatten Antikörper gegen das Virus gebildet, jedoch keinerlei Symptome entwickelt. Seither nimmt man an, dass der Reston-Stamm apathogen für Menschen ist.

1994 kam es zum bisher einzigen Fall einer Infektion des Menschen mit dem Subtyp Ivory Coast. Eine Gruppe von Verhaltensforschern war beim Beobachten einer Schimpansengruppe im Tai-Wald Nationalpark auf einige Affenkadaver abseits der Gruppe gestoßen. Auf der Suche nach der Todesursache infizierte sich eine Forscherin bei der Sezierung eines toten Affen und erkrankte sechs Tage später. Sie überlebte (Formenty et al., 1999).

Im November 2007 wurde im Westen Ugandas, im Bundibugyo Distrikt ein Ausbruch eines hämorrhagischen Fiebers verzeichnet, der sich nach serologischen Untersuchungen als Ebola-Virus herausstellte. In der genetischen Typisierung zeigte sich entfernte Ähnlichkeit mit dem Subtyp Ivory-Coast mit jedoch abweichender Basensequenz zu allen bisher typisierten Stämmen. Alle bislang bekannt gewordenen Ebola-Virus-Epidemien sind in Tabelle 4 aufgelistet.

<b>Jahr</b>	<b>Ebola Sub- typ</b>	<b>Land</b>	<b>Infektionen des Men- schen</b>	<b>Mortalität in Pro- zent</b>
1976	Zaire	Zaire (DRK)	318	88
1976	Sudan	Sudan	284	53
1976	Sudan	England	1	0
1977	Zaire	Zaire	1	100
1979	Sudan	Sudan	34	65
1989	Reston	USA	0	0
1989-90	Reston	Philippinen	0	0
1990	Reston	USA	0	0
1992	Reston	Italien	0	0
1994	Zaire	Gabon	49	59
1994	Ivory Coast	Elfenbeinküste	1	0
1995	Zaire	DRK	315	81
1996	Zaire	Gabon	37	57
1996-97	Zaire	Gabon	60	74
1996	Zaire	Südafrika	2	50
1996	Reston	USA	0	0
1996	Reston	Philippinen	0	0
2000-01	Sudan	Uganda	425	53
2001-02	Zaire	Gabon und DRK	122	79
2002-03	Zaire	DRK	143	89
2003	Zaire	DRK	35	83
2004	Sudan	Sudan	17	41
2005	Zaire	DRK	12	75
2007	Zaire	DRK	264	71
2007-08	Bundibugyo	Uganda	149	25
2008	Reston	Philippinen (bei Schweinen)	0	0

**Tabelle 4 Ebola-Virus Epidemien und Mortalität**

### 1.3.2 Virologie

Die Familie der *Filoviridae* gehört zur Ordnung der *Mononegavirales* und umfasst nur die Gattung Filovirus. Zwei Spezies werden unterschieden, Marburg- und Ebola-Virus. Die Spezies Ebola-Virus gliedert sich in fünf Subtypen auf. Die weitere Unterteilung in Stämme ist in Tabelle 5 dargestellt.

Gattung	Filoviren					
Spezies	Marburg-Virus	Ebola-Virus				
Subtyp	-keiner-	Zaire (ZEBOV)	Sudan (SEBOV)	Reston (REBOV)	Ivory Coast (CIEBOV)	Bundibugyo
Stämme <i>In Klammern: Jahr der Isolierung</i>	Ratayczak (67)	Mayinga (76)	Boniface (76)	Reston (89)	Cote d'Ivoire	Bundibugyo (08)
	Popp (67)	Zaire (76)	Maleo	Philippinen (89)		
	Voegel (67)	Eckron (76)		Siena (92)		
	Ozolin (75)	Tandala (77)		Texas (96)		
	Musoke (80)	Kikwit (95)				
	Marburg Ravn (87)	Gabon (94-97)				

**Tabelle 5 Filoviren, Subtypen und Stämme, in Klammern Jahr der Isolierung**

Den Namen Filovirus erhielt die Gattung aufgrund ihrer Form (lat. *filum*: Faden). Die Partikel sind konstant 80 nm im Querdurchmesser und durchschnittlich 790 nm (Marburg-Virus), bzw. 970 nm (Ebola-Virus) lang. Dabei werden Gesamtlängen bis zu 14.000 nm erreicht. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Viren ihre charakteristische fadenförmige Struktur, die jedoch keineswegs durchweg linear, sondern häufig bizarr gekrümmt ist. Die Viren sind empfindlich gegen Gamma-Strahlung, Äther, Detergenzien, Formalin, Phenol und Chlor und werden bei 60 °C in 30 Minuten inaktiviert (Elliot et al., 1982 / Mitchel et al., 1984 / Cheprunov et al, 1995).

In der Anordnung der sieben Gene innerhalb des einzelsträngigen RNS-Genoms ähneln die Filoviren der Genomstruktur von anderen Mononegavirales wie Rhabdoviren, Bornaviren und Paramyxoviren, besonders der Gattung der Pneumoviren. Die Transkription und Replikation findet im Zytoplasma statt. Insgesamt ist das Genom ca. 19 kb lang und damit das längste bekannte Genom dieser Ordnung. Am 3'- und am 5'-Ende befinden sich konservierte komplementäre nicht-genomische Sequenzen. Die Gene selber sind mit konservierten Transkriptionssignalen eingefasst. Eine Startsequenz befindet sich am 3'-Ende

und als Stoppsignal dient eine Serie von fünf bis sechs Us, die wiederholt abgelesen für die Polyadenylierung der mRNA sorgt. Einzigartig für Filoviren innerhalb ihrer Ordnung findet sich sowohl bei den Start- als auch bei den Stoppsequenzen eine gemeinsame pentamerische Sequenz wieder. Am 5'-Ende von Startsequenzen und am 3'-Ende von Stoppsequenzen ist die Sequenz 3'UAAUU vor- bzw. nachgeschaltet (Feldmann et al., 1992 / Sanchez et al., 2005). Außerdem haben die Gene häufig lange nicht-codierende Sequenzen an ihren 3'- und/oder 5'-Enden, die zum einen die ungewöhnliche Länge des Filovirusgenoms erklären und zum anderen wahrscheinlich eine Rolle bei der Stabilität der Transkripte spielen. Die Transkripte selbst weisen am 5'-Ende Sequenzen auf, die das Potential besitzen stabile, sogenannte „Hairpin-Strukturen“ zu bilden, deren Funktion wahrscheinlich in der Fähigkeit zur Bindung an Ribosomen und in der Stabilisierung des Transkriptes an sich liegt (Feldmann et al., 1992 / Sanchez et al., 1993 & 2005 / Mühlberger et al., 1996).

### 1.3.3 **Reservoir**

Ein breites Spektrum von Wirten wurde in Betracht gezogen, darunter Insekten, Parasiten, Nagetiere, Fledermäuse und sogar Pflanzen. Affen und Menschen scheiden weitestgehend aus, da die Infektion in zu hohem Maße letal verläuft als das davon ausgegangen werden kann, dass die Viren in diesen Populationen persistieren. Serologische Untersuchungen erbrachten allerdings Anhaltspunkte, dass sowohl beim Affen als auch beim Menschen häufiger asymptomatische Infektionen auftreten, als bisher angenommen (Gonzalez et al., 2000 / Leroy et al., 2004).

Ende des Jahres 2005 entdeckte ein Forscherteam mittels RT-PCR und IgG-Nachweis drei Flughundspezies (*Hypsignathus monstrosus*, *Epomops franqueti*, *Myonycteris torquata*), die mit Ebola-Virus infiziert zu sein schienen. Allerdings war bei diesen Flughunden jeweils nur entweder die PCR- oder die IgG-Reaktion positiv (Leroy et al., 2005). Eine dauerhafte Ausscheidung der Viren in hoher Dosis ist entsprechend unwahrscheinlich, zumal die Viruslast in den Tieren nicht besonders hoch war und nur über eine nested-PCR nachgewiesen werden konnte. Eine Anzucht des Erregers scheiterte gänzlich. Ebenso

verhielt es sich im Rahmen einer früheren Studie mit Nagetieren in der Zentralafrikanischen Republik (Morvan et al., 1999).

In 2007 konnte erstmals in weiteren, augenscheinlich gesunden Flughunden (*Rousettus aegyptiacus*) eine Marburg-Virus Infektion mittels RNS- und IgG-Nachweis in Gabon und der Demokratischen Republik Kongo gesichert werden (Towner et al., 2007).

#### 1.3.4 Virale Proteine

##### 1.3.4.1 Oberflächenglykoprotein (GP)

Das GP ist das einzige Oberflächenprotein bei den Filoviren. Demzufolge muss es die entscheidende Rolle bei der Interaktion mit Zellen oder der Bindung von Antikörpern spielen.

Beim Marburg-Virus codiert ein einzelner Offener Leserahmen (OLR) für das 220 kDa große Typ I Transmembranprotein (Feldmann et al., 1992). Es beginnt mit einer N-terminalen Signal-Sequenz und endet mit einem hydrophoben Anker am C-Terminus.

Im Gegensatz dazu befindet sich die Erbinformation für das GP beim Ebola-Virus auf zwei OLR. Die Translation des ersten Teils alleine führt zu einem kleineren nicht-strukturellen GP, das von infizierten Zellen in großer Menge sezerniert wird (sGP). Das sGP steht im Verdacht neutralisierende Antikörper abzufangen und somit die Immunabwehr zu kompromittieren (Ito et al., 2001).

Erst über transkriptionelles Editieren oder eine Rastermutation durch die Polymerase entsteht das vollständige Produkt. Entscheidend ist, dass bei der Transkription einer Serie von sieben Us im viralen Genom ein zusätzliches A eingefügt wird (Sanchez et al., 1996 / Volchkov et al., 1995). Dadurch werden die beiden OLR verbunden und das komplette Protein kann translatiert werden. Dem GP wird die Hauptkomponente der Pathogenität des Ebola-Virus zugesprochen. Die Synthese induzierte zytotoxische Effekte in menschlichen Endothelzellen *in vitro* und *in vivo* und erhöhte somit die Gefäßpermeabilität (Yang et al., 2000). Als notwendig für den Effekt zeigte sich die Serin-Threonin reiche, Mucin ähnliche Region. In einer weiteren Untersuchung wurde festge-

stellt, dass die Expression von GP an der Plasmamembran sowohl zelleigene Oberflächenproteine inklusive MHC1-Molekülen, als auch die eigenen antigenen Epitope maskiert. Dadurch wird die Illusion des Verschwindens der Zelle erzeugt (Reynard et al., 2009).

Mit 170 kDa glykolisierte GP wird nahe des C-Terminus einmalig von einer Protease gespalten. Dadurch entstehen das 140 kDa große GP<sub>1</sub> und das 26 kDa große GP<sub>2</sub>, die durch Disulfidbrücken verbunden sind (Volchkov et al., 1998). Bei keinem der Filoviren hat man bisher eine Neuraminidaseaktivität des GP finden können (Sanchez, Geisbert, Feldmann, 2007).

#### **1.3.4.2 Matrixproteine (VP40, VP24)**

Das VP40 liegt der Innenseite der Plasmamembran an und spielt eine entscheidende Rolle bei der Knospung und Formung neuer Viruspartikel. Dabei ist es ebenfalls für die Entstehung der charakteristischen filamentösen Struktur verantwortlich. *In vitro* bildet es zusammen mit einzelsträngiger RNS Octamere, die in ihrer zentralen Pore sequenzspezifisch RNS binden können. Dies ist für die Bildung von infektiösen Partikeln von elementarer Bedeutung (Hoenen et al., 2005).

VP24 ist das dritte membranassoziierte Protein. Seine Funktion ist noch Gegenstand der Forschung. Man vermutet aber, dass es bei der Zusammenstellung neuer Viruspartikel interagiert, insbesondere beim Aufbau des Nukleokapsids (Han et al. 2003).

#### **1.3.4.3 Nukleoproteine (NP, VP30)**

Das Hauptstrukturprotein des Nukleokapsids ist das NP. Es ist etwa 96 – 104 kDa groß und phosphoryliert. Es bindet virale RNS und interagiert bei der Freisetzung von Viruspartikeln mit dem GP und VP40 (Licata et al., 2004). Zusammen mit den Proteinen VP35 und L steuert es die virale Replikation.

Als weitere Komponente des Nukleokapsids findet sich das VP30, das ebenfalls die Fähigkeit besitzt RNS unspezifisch zu binden. Obwohl es bei der Replikation der viralen RNS keinen Einfluss zu nehmen scheint, steigert es signifikant



die Synthese von viraler mRNS. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Phosphorylierung des Proteins und der Aktivierungseffizienz entdeckt. Stark phosphoryliertes VP30 aktiviert die Transkription weniger gut als schwach bzw. nicht-phosphoryliertes, lagert sich dafür aber in nukleokapsidartigen Strukturen ein. Zudem zeigt es die Tendenz sich zu Oligomeren zusammenzulagern, was für die aktivierende Funktion bei der RNS-Synthese und Ausbreitung von Ebola-Viren in Zellkultur essentiell ist, nicht aber für die Einlagerung in das Nukleokapsid (Hartlieb et al., 2003).

#### **1.3.4.4 Polymerase (L)**

Die Polymerase ist mit 220 kDa (2331 AS) das größte aber dafür am geringsten exprimierte Gen-Produkt. Sie katalysiert als RNS-abhängige RNS-Polymerase die Replikation und Transkription des viralen Genoms.

#### **1.3.4.5 VP35**

Dieses Protein entspricht dem P-Protein von anderen Mononegavirales, ist aber nur schwach phosphoryliert, was es von allen anderen P-Proteinen dieser Ordnung unterscheidet. Es leistet einen Beitrag bei der Replikation der RNS. Es konnte bewiesen werden, dass beim Marburg-Virus die Proteine NP, L, und VP35 für die Transkription, Replikation und Enkapsidierung ausreichend sind (Mühlberger et al., 1998). Bei analogen Untersuchungen mit Ebola-Zaire war zudem VP30 notwendig (Volchkov et al., 2001).

Außerdem verhindert es die adäquate zelluläre Reaktion auf eine Virusinfektion indem es die Aktivierung (Phosphorylierung) von Interferon Regulierender Faktor 3 (IRF-3) blockiert (Basler et al., 2003). Aktivierter IRF-3 setzt als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl von Prozessen in Gang, die eine vermehrte Abwehrbereitschaft der Zelle gegen Viren, bis hin zur Apoptose, nach sich ziehen.

#### **1.3.5 Infektion, Replikation**

Für die Infektion der Zelle ist eine rezeptorvermittelte Endozytose nötig. Erst 2006 konnten Rezeptoren der Tyro3-Familie (Rezeptor-Tyrosinkinasen) für diesen Vorgang identifiziert werden (Shimojima et al., 2006). Für das Ebola-Zaire-Virus konnte 2008 gezeigt werden, dass eine Aktivierung der Phosphoinositid-

3-Kinase stattfindet, die die endosomale Internalisierung bewirkt (Saeed et al., 2008). Für myeloische Zellen wurde 2007 der Glykorezeptor „liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin“ (LSEctin) als Vermittler der Bindungskapazität für Ebola-Viren entdeckt (Dominguez-Soto et al., 2007).

Im Zytoplasma vollziehen sich die Replikation und Transkription. Die Transkription beginnt am 3'-Ende des Genoms und produziert sieben polyadenylierte mRNS-Stränge. Deren Translation führt zunächst zu einer Akkumulation von NP und VP35. Diese Anreicherung bewirkt durch einen unbekannten Mechanismus ein Umschalten von Transkription zu Replikation (Sanchez, Geisbert, Feldmann, 2007). Im Zytoplasma bilden sich charakteristische Einschlusskörperchen aus Nukleokapsiden (Kolesnikova et al., 2000). An der Außenseite der Zellmembran lagern sich die neu gebildeten GP an, an der Innenseite die Matrixproteine. Wenn ausreichende Konzentrationen der Nukleokapsid- und Hüllproteine erreicht wurden, vereinigen sich diese an der Zellmembran (Jasenosky, Kawaoka, 2004).

### 1.3.6 **Pathologie, Pathogenese und Immunologie**

Aufgrund der geringen Fallzahlen und dem hohen Infektionsrisiko bei Sektionen gibt es nur wenige ausführliche Dokumentationen der mikro- und makroskopischen Pathologie nach Filovirusinfektionen. Dafür existieren brauchbare Modelle in Tierversuchen, die vergleichbare Krankheitsverläufe provozieren und die resultierenden Organschädigungen korrelieren mit denen, die beim Menschen gefunden werden.

Die auffälligsten Veränderungen sind Einblutungen in Haut und Schleimhäute als auch in die Lumina des Gastrointestinaltraktes. Leber, Milz und Gehirn sind ödematös geschwollen. Mikroskopisch finden sich multifokale Nekrosen des Leberparenchyms und in den Hepatozyten sind lichtmikroskopisch eosinophile Einschlusskörperchen zu erkennen, die als Konglomerate von Nukleokapsiden identifiziert werden konnten (Ryabchikova et al., 1996). Follikuläre Nekrosen treten in Milz, Lymphknoten, Nieren, Nebennieren, Hoden und Ovarien auf. Keine dieser makroskopischen und mikroskopischen Organschädigungen für sich ist allerdings so ausgeprägt, dass sie als Ursache für einen fatalen Aus-

gang verantwortlich gemacht werden könnte. Bei der Entstehung des tödlichen Volumenmangelschocks vermutet man als Auslöser eine überschießende Immunantwort. Bei Patienten mit tödlichem Verlauf fanden sich hohe Spiegel von IFN- $\gamma$  (>100 pg/ml) IFN- $\alpha$  und TNF- $\alpha$  sowie anderer Zytokine (Villinger et al., 1999). In infizierten Zellen wird die antivirale Wirkung (z.B. Stimulierung der MHC1 Expression, Supprimierung der Proteinbiosynthese) des IFN- $\alpha$  jedoch blockiert (Harcourt et al., 1999) und TNF- $\alpha$  erhöht die Permeabilität von Endothelzellen *in vitro* (Chen, Cosgriff, 2000).

Als erstes infizieren Filoviren Makrophagen und Monozyten, also Zellen, die eine bedeutende Rolle bei der Initiierung und Aufrechterhaltung der spezifischen und unspezifischen Immunantwort spielen und außerdem eine Vielzahl potenter Mediatoren produzieren, die bei Überexpression einen pathogenen Effekt auf den Organismus haben und Einfluss auf die Hämostase nehmen (Ströher et al., 2001). Zudem wird vermutet, dass die Abwehrzellen durch ihre Beweglichkeit entscheidend dazu beitragen, dass sich das Virus im Körper und den Organen effizient ausbreiten kann. Auch dendritische Zellen werden infiziert und können ihre wichtigste Funktion, die Präsentation von Antigenen nicht mehr wahrnehmen. Als nächstes werden Hepatozyten infiziert, die unter normalen Umständen viele wichtige Gerinnungsfaktoren produzieren. Im finalen Stadium der Infektion werden Endothelzellen und Fibroblasten infiziert (Ryabchikova, 1999).

Abgesehen von der objektiv vorhandenen Thrombopenie wurde zudem festgestellt, dass bereits zu Beginn der Erkrankung eine ausgeprägte Dysfunktion der verbleibenden Blutplättchen besteht, die auf eine *in vivo* Aktivierung und Degranulation zurückgeführt wird und in einer Störung der Plättchenaggregation *in vitro* resultiert (Fisher-Hoch et al., 1985).

Zusätzlich zu der direkten Infektion und Schädigung immunkompetenter Zellen konnte auf dem Glykoprotein eine potentiell immunsupprimierende Domäne gefunden werden, wie sie auch schon in Hüllproteinen einiger Retroviren gefunden wurde. Für Endothelzellen konnte bewiesen werden, dass das GP die

Hauptkomponente für die zytotoxische Wirkung in Form einer muzinähnlichen serin- und threoninreichen Region bereitstellt (Yang et al., 2000).

#### 1.3.7 **Klinik**

Die Klinik von Marburg-Virus- und Ebola-Virusinfektionen ist nicht voneinander zu unterscheiden. Auch die Abgrenzung zu anderen hämorrhagischen Fiebern wie z.B. Lassafieber oder Gelbfieber kann nur durch eine spezifische Diagnostik erfolgen. Bakteriologische oder parasitäre Infekte, die in den Endemiegebieten der Filoviren weitaus häufiger auftreten, präsentieren sich ebenfalls mit den gleichen (Allgemein-)Symptomen und können gelegentlich mit einer erhöhten Blutungsneigung einhergehen. Demzufolge sollte die Diagnose für ein von Filoviren verursachtes HF erst gestellt werden, wenn alle behandelbaren Differentialdiagnosen ausgeschlossen wurden oder ein eindeutiges molekularbiologisches Ergebnis vorliegt.

Die Inkubationszeit beträgt meistens etwa sechs Tage, sie kann allerdings von zwei Tagen bis zu drei Wochen variieren. Ein abrupter Beginn mit Fieber, Übelkeit und Erbrechen, Schwäche, Bauchschmerzen, Muskel- und Gelenkschmerzen, Kopfschmerzen und Durchfall kennzeichnen das Initialstadium.

In den nächsten zwei bis drei Tagen verschlechtert sich das Krankheitsbild. Übelkeit und Erbrechen nehmen zu, exazerbierend kommt es zu Hämatemesis und Meläna. Das Bewusstsein trübt zusehends ein. Patienten mit fatalem Krankheitsverlauf entwickeln eine Tachypnoe und Anurie als Zeichen einer Lungen- bzw. Nierenbeteiligung, präfinal sinkt die Körpertemperatur. Ein makulopapulöses Exanthem, das sich gegen Ende der ersten Krankheitswoche am ganzen Körper ausbreitet, ist das spezifischste klinische Symptom für eine Filovirusinfektion im Vergleich zu anderen hoch-fieberhaften Infektionskrankheiten. Nur selten tritt es auch im Rahmen einer Dengue- oder Lassa-Virusinfektion auf. Bei dunkelhäutigen Patienten, die für gewöhnlich das Gros des Patientenkollektivs stellen, ist es allerdings schwierig zu erkennen. Wird die Infektion überlebt, kommt es zur Desquamation der Haut über den betroffenen Arealen (Sanchez, Geisbert, Feldmann, 2007).

Im Mittel tritt nach etwa 10 Tagen nach Krankheitsbeginn der Tod ein (Varianz: 3-21 Tage) (Bwaka et al., 1999).

Bei der Kikwit-Epidemie kam es in 45 % der Fälle zu Blutungserscheinungen, welche aber nicht zwingend mit einer infausten Prognose einhergingen (Bwaka et al., 1999). Siehe auch Tabelle 6. Selten wurden massive Hämorrhagien beobachtet, ferner kam es zu petechialen Blutungen, Ekchymosen, hämorrhagischer Konjunktivitis und andauernder Blutung aus Venenpunktionen. Die Infektion schwangerer Frauen führt regelmäßig zum Abort und unter der Geburt infizierte Neugeborene überleben praktisch nie.

Die Rekonvaleszenzphase dauert 5 Wochen und länger. Die Patienten leiden weiterhin an ausgeprägter Schwäche, Gewichtsverlust und Amnesie über den Zeitraum der akuten Krankheitsperiode. Arthralgien, bevorzugt der großen Gelenke, und Haarausfall werden noch Wochen nach der Erkrankung beobachtet. Die Virämie endet mit dem Ausschleichen der Symptome nach der akuten Krankheitsphase, aber an einigen, aus immunologischer Sicht besonderen Geweben, konnte bei manchen Patienten auch nach Genesung noch einige Zeit der Erreger bzw. dessen Genom nachgewiesen werden. In der vorderen Augenkammer und der Samenflüssigkeit können die Viren bis zu drei Monate persistieren (Gear et al., 1975), so dass die Gefahr einer Übertragung auf Sexualpartner gegeben ist und den Betroffenen die Verwendung von Kondomen empfohlen werden sollte.

	Patients who died ( <i>n</i> = 84)	Patients who survived ( <i>n</i> = 19)	<i>P</i> *
Symptoms			
Asthenia	85	95	
Diarrhea	86	84	
Nausea and vomiting	73	68	
Abdominal pain	62	68	
Headaches	52	74	
Sore throat, odynophagia, or dysphagia	56	58	
Arthralgia or myalgia	50	79	.022
Anorexia	43	47	
Lumbar pain	12	26	
Cough	7	26	.028
Chest pain	10	5	
Hearing loss	5	11	
Tinnitus	1	11	
Dysesthesia	0	5	
Signs (nonbleeding)			
Fever	93	95	
Conjunctival injection	42	47	
Tachypnea	31	0	.027
Hiccups	17	5	
Rash	14	16	
Anuria	7	0	
Hepatomegalia	2	5	
Splenomegalia	2	5	
Fetal loss	2	5	
Convulsions	2	0	
Bleeding signs			
Gums	15	0	
Hematemesis	13	0	
Melena	8	16	
Hematuria	7	16	
Puncture sites	8	5	
Bloody stools	7	5	
Petechiae	8	0	
Epistaxis	2	0	
Hemoptysis	0	11 (2 cases)	.033
Hematoma	2	0	
Total	42	37	

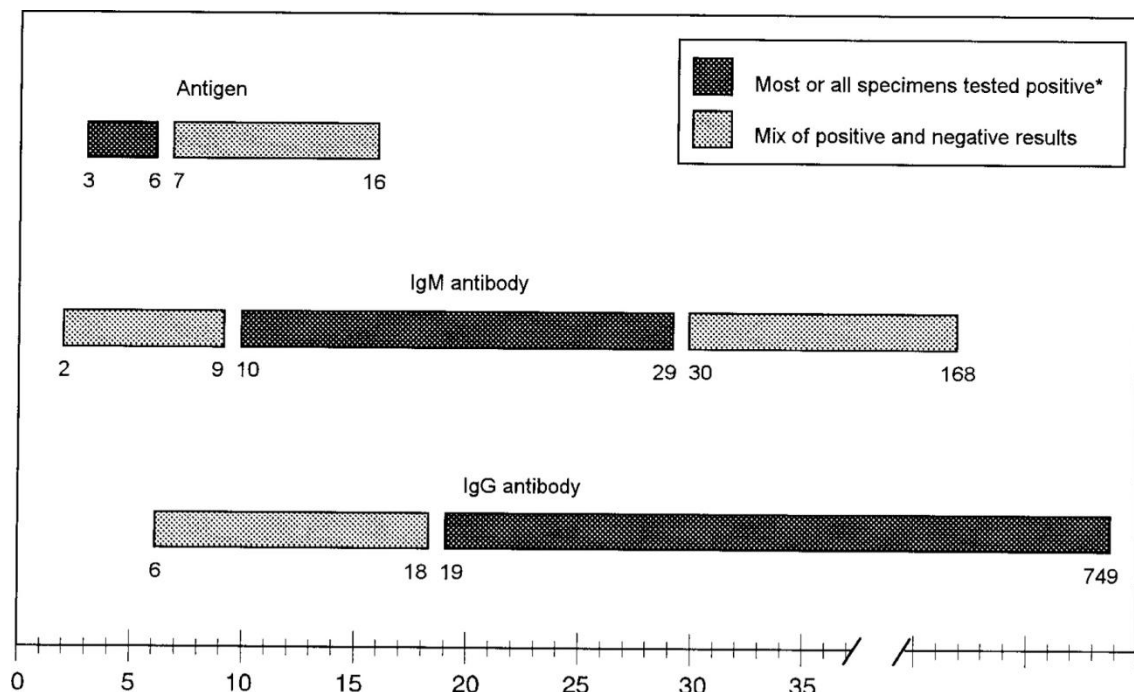
\* Fisher's exact test, two-tailed; value indicated only when *P* < .05.

***Tabelle 6 Häufigkeit der Symptome bei 103 Patienten während des 1995 Ebola-Ausbruchs in der Demokratischen Republik Kongo unter Berücksichtigung des Krankheitsverlaufs***  
***Aus Bwaka MA et al., 1999***

### 1.3.8 Diagnostik und klinische Parameter

Die Diagnose kann entweder mittels RT-PCR oder dem Nachweis spezifischer IgM-/IgG Antikörper aus Patientenserum erfolgen. Weitere Möglichkeiten bieten die Anzucht in Zellkulturen oder die Markierung viraler Antigene mit Immunfluoreszenzantikörpern (IFA) oder im ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Eine direkte Darstellung des Erregers im Elektronenmikroskop ist ebenfalls denkbar. Das mitunter größte Problem in der Diagnostik ist die Gewährleistung der notwendigen L4 Bedingungen zur Entnahme und Aufbereitung der Proben vor Ort. Zudem sind die meisten Krankenhäuser auf dem afrikanischen Kontinent, insbesondere in ländlichen Gegenden, nicht mit den nötigen modernen Geräten und finanziellen Mitteln ausgestattet, um die aufwendige Diagnostik lückenlos durchführen zu können.

Die bewährtesten Methoden in der Akut-Diagnostik sind der Antigen-ELISA und die PCR. Abb. 2 bietet einen Überblick über das Auftreten von Antigenen und Antikörpern im Verlauf der Infektion. Ein Anstieg der IgG Konzentration um das Vierfache oder der Nachweis von spezifischem IgM gelten als ausreichend für die Diagnosestellung (Grolla et al., 2005). Hierbei muss bedacht werden, dass manche Patienten erst gegen Ende der ersten Krankheitswoche beginnen, IgM-Antikörper zu bilden, einige bilden überhaupt keine nachweisbaren Antikörper.



**Abb. 2** Antigen und Antikörper-Antwort bei Ebola-HF Überlebenden im zeitlichen Verlauf angegeben in Tagen 1995-1997. Aus Rowe AK et al., 1999

Im Tierversuch zeigt sich im Blutbild bereits im frühen Krankheitsstadium eine Lymphopenie und Neutrophilie sowie, ab dem 3-4 Tag, einen ausgeprägten Abfall der Thrombozyten. Die Gerinnungsparameter weisen verlängerte Koagulationszeiten auf und Fibrinspaltprodukte finden sich als Anzeichen einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) (Geisbert et al., 2003). Die Lebermarker AST (GOT) und ALT (GPT) sind erhöht (typischerweise AST>ALT), wobei die alkalische Phosphatase (AP) und die Bilirubinwerte allenfalls grenzwertig erhöht sind. In manchen Fällen kann im späteren Krankheitsverlauf ein Ikterus beobachtet werden. Ein Anstieg der Retentionsparameter Harnstoff und Kreatinin kündigt eine Verschlechterung der Schocksituation an.

#### 1.3.9 Therapie & Prophylaxe

Es gibt weder eine kausale Therapie gegen Infektionen mit Filoviren, noch gibt es eine sichere Prophylaxe im Sinne einer Impfung. Im Tierversuch wurden jedoch bereits Erfolge mit potentiellen Impfstoffen erzielt, die mittel- bis langfristig zur Einführung einer wirksamen Vakzine führen könnten (Jones et al., 2005; Swenson et al., 2005).

Das beim Lassa- und Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber-Virus wirksame Virostatikum Ribavirin erwies sich bei Filoviren, sowohl *in vitro* als auch im Tierversuch, als wirkungslos. Erfolg versprechend verliefen Versuche mit Rhesus-Affen mit einem rekombinanten Inhibitor des Gewebefaktors VIIa, der 6 bzw. 24 Stunden nach Injektion einer tödlichen Ebola-Dosis appliziert wurde (Geisbert et al., 2003). Im Tierversuch mit Mäusen erwies sich ein Adenosin-Analogon als tauglich, einen tödlichen Verlauf zu verhindern. Eine einmalige Dosis genügte, musste jedoch innerhalb eines relativ kurzen Zeitfensters, nämlich am 2. oder 3. Tag post infectionem verabreicht werden (Bray et al., 2000). Die Gabe von Rekonvaleszentenserum schützt nicht vor einem fatalen Ausgang der Krankheit, hat aber im Tiermodell hoch dosiert die Potenz das Einsetzen von Symptomen zu verzögern (Sullivan et al., 2003). Dadurch könnte es einem Organismus zeitlich ermöglicht werden, die eigene Immunantwort zu mobilisieren, bevor er der Infektion erliegt.



Die Patienten müssen intensivmedizinisch betreut und es muss eine unterstützende Therapie zur Erhaltung der Organfunktionen angeboten werden. An erster Stelle steht die adäquate Substitution von Flüssigkeit; die Funktion der Nieren sollte dabei ebenso engmaschig überwacht werden wie die Entwicklung eines Hirnödems. Die oft beobachtete interstitielle Pneumonie erfordert unter Umständen die Insufflation von Sauerstoff oder sogar eine künstliche Beatmung. Die Gabe von Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren zur Normalisierung der Gerinnung kann erwogen werden. Heparin zur Behandlung einer DIC sollte nur in eindeutigen Fällen eingesetzt werden und benötigt eine sorgsame Überwachung der Gerinnungswerte. Eine bakterielle Superinfektion als schwerwiegende Komplikation gilt es zu vermeiden und die Indikation zur Gabe von Antibiotika ist frühzeitig zu stellen.

Zum Schutz des Personals und anderer Patienten sind strenge Schutzmaßnahmen bei der Betreuung der Patienten einzuhalten. Als Erstes müssen die Betroffenen streng isoliert und Kontaktpersonen ausfindig gemacht und unter Quarantäne gestellt werden. Zum Zweiten muss das Pflegepersonal sich bestmöglich vor einer Infektion bei der Patientenversorgung schützen. Hierzu zählt das Tragen von Atemmasken, Schutzbrillen, zwei Paar Handschuhen, Plastiküberschuhen und geeigneten Seuchenschutzanzügen. Alle Ausscheidungen des Patienten müssen umgehend und unter Einhaltung der Hygiene entsorgt werden. Die vorherige Aufnahme von Flüssigkeiten in Zellulose ist wünschenswert. Dass auch der Schweiß der Patienten infektiös ist, sollte bei der Entsorgung von Abwasser z.B. nach dem Waschen bedacht, und ein geeignetes Desinfektionsmittel zur Dekontamination eingesetzt werden, wenn kein Autoklav zur Verfügung steht. Im Todesfall muss der Leichnam in eine flüssigkeits- und gasdichte Plastikhülle gelegt werden, die vor dem Transport äußerlich desinfiziert wird. Die Einäscherung ist einer Beerdigung vorzuziehen.

## 1.4 **Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber Virus (CCHFV)**

### 1.4.1 **Allgemeines**

Die ersten Berichte über CCHF stammen vermutlich aus dem 12. Jahrhundert, aus dem Gebiet, das heute Tadschikistan genannt wird. In Zentralasien sind allerdings einige mit Hämorrhagien einhergehende Krankheiten endemisch, die dem Krankheitsbild des CCHF sehr ähneln können und deshalb nicht sicher abgrenzbar waren.

Erst 1944-45 entstand der erste ausführliche Bericht während einer Epidemie in der westlichen Krim-Region Russlands und die Vermutung einer viralen Genese durch M. Chumakov. Es dauerte jedoch weitere 2 Jahrzehnte, bis 1967 im Tierversuch mit Ratten und Mäusen das Virus als Erreger isoliert werden konnte (Chumakov, Butenko, 1968).

Zunächst gab man dem Virus den Namen Krim Hämorrhagisches Fieber Virus, stellte 1969 jedoch fest, dass der vermeintlich neu entdeckte Erreger bereits 1956 bei einem Kind im Kongo isoliert worden war und dieser Erreger darauf Kongo-Virus getauft wurde (Casals, 1969). Letztendlich setzte sich international die Bezeichnung Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber Virus durch. In der Literatur wird die Mortalitätsrate mit durchschnittlich 30-50 % angegeben (Hoogstraal, 1979; Whitehouse, 2004).

Das bisherige Unvermögen CCHFV in großem Maßstab zu produzieren ist der einzige Grund, warum es nicht zu den in der Kategorie A aufgeführten Agenzien für biologische Kampfstoffe gezählt wird (CIDRAP (Internetressource), 2009). Die notwendige Virulenz und Kontagiösität besitzt es allemal.

### 1.4.2 **Epidemiologie**

Das CCHFV ist geographisch eines der weltweit verbreitetsten, von Zecken übertragenen Viren. Erkrankungen wurden aus Asien, Südosteuropa, dem Mittleren Osten und vielen Ländern Afrikas gemeldet (WHO, Fact sheet Nr 208). Noch immer erweitert es, entsprechend der Verbreitung seiner Vektoren, sein

Endemiegebiet. Die Türkei z.B. meldete in den Jahren 2002 und 2003 erstmalig bestätigte Fälle der bedrohlichen Zoonose (Karti et al., 2004).

Insgesamt 31 Zeckenarten und eine Stechmückenart (*Culicoides* spp.) wurden bisher entdeckt, die das Virus in sich trugen (Hoogstraal, 1979; Linthicum and Bailey, 1994). Der wichtigste und effizienteste Vektor sind Zecken der Gattung *Hyalomma*, gefolgt von *Rhipicephalus* und *Dermacentor*. *Hyalomma* sticht und überträgt seine infektiösen Passagiere auch auf eine breite Palette wilder und domestizierter Pflanzen fressender Tiere wie z.B. Schafe und Rinder. Die Tiere selbst bleiben meist klinisch unauffällig, entwickeln aber eine ausreichende Viruslast, um wiederum weitere Zecken zu infizieren (Davies, Mwakima., 1982).

Eine interessante Beobachtung machte man bei dem Versuch Vögel mit CCHFV zu infizieren. Die Vögel entwickelten weder eine nachweisbare Virämie, noch bildeten sie Antikörper, sie scheinen grundsätzlich immun gegen das Virus zu sein (Berezin et al., 1971). Dieser Beobachtung unter experimentellen Bedingungen entsprechend fand man CCHFV-positive Zecken im Gefieder einiger Vögel, die selbst keinerlei Anzeichen einer akuten oder abgelaufenen Infektion aufwiesen. Eine Rolle in der Ökologie des CCHFV könnten die geflügelten Wirbeltiere als eine Art Zeckentaxi spielen und bei ihren Ausflügen die Zecken mit dem Virus verbreiten.

Strauße entziehen sich der Regel ihrer Klasse und können sich mit CCHFV infizieren. In Südafrika ist es schon einige Male beim Schlachten der Tiere zur Übertragung auf Menschen gekommen (Van Eeden et al., 1985).

Besonders gefährdet für Infektionen sind Personen, die berufsbedingt engen Kontakt mit Tieren und somit auch zu ihren Ektoparasiten haben. In der Fleischverarbeitung besteht ebenfalls ein erhöhtes Risiko durch die Exposition mit infektiösem Blut oder Fleisch von befallenen Tieren. In den Endemiegebieten treten sporadisch immer wieder Infektionen auf, selten nehmen sie größere Ausmaße an, wie sie z.B. bei Marburg- oder Ebola-Virus Ausbrüchen beobachtet werden. Gelegentlich kommt es zu nosokomialen Folgeinfektionen.

### 1.4.3 Virologie

Das CCHFV gehört zur Gattung der Nairoviren, die der Familie der Bunyaviridae untergeordnet werden. Über 300 Viren sind dieser Familie zugehörig und nicht wenige sind als humanpathogen bekannt. Die Bunyaviridae gliedern sich insgesamt in fünf Gattungen auf:

- Bunyavirus
- Hantavirus
- Nairovirus
- Phlebovirus
- Tospovirus (Pflanzenpathogen)

Vektoren dieser Viren sind im Allgemeinen Arthropoden wie Moskitos und Zecken, nur die Hantaviren werden über Ausscheidungen von Nagetieren übertragen.

Die CCHF-Virionen sind sphärisch und ca. 90 nm im Durchmesser. An ihrer Oberfläche erkennt man die beiden Glykoproteine  $G_N$  und  $G_C$ , die 5 – 10 nm lange Spikes aufwerfen und von einer Lipiddoppelmembran umgeben sind (Schmaljohn, Nichol, 2007). Das Genom, welches für insgesamt 4 Proteine codiert, besitzt drei Segmente: L, M und S. Sie bestehen aus einzelsträngiger RNS mit negativer Orientierung und besitzen hochkonservierte komplementäre Sequenzen an ihren Enden, die dafür sorgen, dass die Segmente Schleifen ausbilden und so gleichzeitig einen Promoter für die Polymerase bereitstellen. Die RNS-abhängige RNS Polymerase wird von dem L-Segment kodiert. Das CCHFV besitzt 2 Glykoproteine,  $G_N$  und  $G_C$ , deren Gene beide auf dem M-Segment liegen und die nach ihrer Biosynthese von zellulären Proteasen gespalten werden. Das kleinste der viralen Proteine, das Nukleoprotein (N), liegt entsprechend auf dem kürzesten der Segmente: S. Zusammen mit den Hantaviren haben die Nairoviren die simpelste Replikationsstrategie innerhalb der Familie der Bunyaviridae.

Neu produzierte Viren knospen aus dem Golgi-Apparat, von dem sie auch ihre Lipidhülle rekrutieren (Ellis et al., 1981). Hauptverantwortlich für die Kompartimentierung scheint ein Motiv des  $G_N$ -Proteins zu sein, das sich in der

Golgi-Membran einlagert. Auf dem Weg durch das Zytoplasma zieht das  $G_N$  das  $G_C$ -Protein über Wechselwirkung mit sich (Haferkamp et al., 2005).

#### 1.4.4 **Klinik und Pathologie**

Der Verlauf des CCHF kann in vier Stadien eingeteilt werden:

- Inkubation
- Prähämorrhagisch
- Hämorrhagisch
- Rekonvaleszenz

(Hoogstraal, 1979)

Die Inkubationszeit beträgt 2-12 Tage, bei nosokomialen Infektionen wird sie auf 3-6 Tage beziffert. Die prähämorrhagische Phase beginnt schlagartig mit grippeähnlichen Symptomen wie allgemeiner Müdigkeit, Arthralgien, Myalgien, Rücken- und Bauchschmerzen, Kopfschmerzen, Photophobie, Halsschmerzen, Appetitlosigkeit, Schüttelfrost, Übelkeit und Erbrechen. Bewusstseinsveränderungen von gesteigerter Aggressivität bis zur Bewusstlosigkeit wurden beobachtet (WHO, Fact sheet Nr 208). Bei 50 % der Patienten entwickelt sich eine Hepatomegalie. Eine Rötung des Gesichtes und des Nackens einhergehend mit Ödembildung ist typisch. An den Konjunktiven und dem Pharynx kann eine Hyperämie auftreten. Der Fieberverlauf kann biphasisch sein, nach zwei fieberfreien Tagen kehrt das Fieber zurück und geht dann einher mit Epistaxis, Petechien, Purpura und Thrombozytopenie. In mittelschweren Fällen dauert das Fieber zwischen 5 und 20 Tagen, im Durchschnitt sind es 9. Die hämorrhagischen Verläufe beginnen meist zwischen dem 3. und dem 6. Tag mit anhaltenden Blutungen aus Nadeleinstichstellen. Besonders im späteren Stadium korreliert das Ausmaß der Blutungsneigung gut mit dem Grad der Leberschädigung. Bei Patienten mit letalem Verlauf steigen die Leberenzyme in beachtlichem Umfang und es finden sich abnorme Werte von Fibrinogen und Fibrinabbauprodukten sowie verlängerte Gerinnungszeiten wie Prothrombinzeit, Thrombinzeit und der aPTT (Chen, Cosgriff, 2000). Als schwere Komplikation kann es zum Schock kommen und weitere lebensgefährliche Organschädigungen verursachen. Viele der bedrohlichen klinischen Symptome zeichnen sich bereits in einem frühen Stadium der Erkrankung ab und korrelieren in ihrer

Ausprägung mit einem tödlichen Ausgang (Swanepoel et al., 1989). Dies sind insbesondere Gehirnblutungen, schwere Dehydratation und Anämie, Schock mit anhaltender Diarrhö, Lungenödem, Pleuraerguss und Myokardinfarkt. Multiple Organschädigungen werden häufig beobachtet.

Die Rekonvaleszenzphase beginnt nach 15-20 Tagen und dauert 2 bis 4 Monate bis hin zu einem Jahr und länger. In dieser Zeit leiden die Patienten an Asthenie, Verwirrung, Alopezie, Neuralgien und Hypotonie. Desweiteren können vegetative Symptome wie Schwitzen, Appetitlosigkeit und Schwindel/Übelkeit auftreten (Hoogstraal, 1979).

Über die Pathologie des CCHF ist wenig bekannt, denn zusätzlich zu der Notwendigkeit mit dem Virus in den seltenen Hochsicherheitslaboren der Stufe 4 zu arbeiten, gibt es keine Tierversuchsmodelle, die Aufschluss über die Pathogenese des Virus im Organismus geben könnten. In der Leber finden sich disseminierte fokale Nekrosen bis hin zum flächendeckenden Zelluntergang. Der Knochenmarkbefund ist nicht einheitlich, aber lässt eine Hypoplasie und eine verminderte Anzahl von Megakaryozyten erkennen (Swanepoel et al., 1989).

Ein entscheidender Beitrag zu der hohen Pathogenität des CCHFV wird von den Glykoproteinen vermutet. Bei der Vorstufe fand sich ein Bereich, der sehr der Region ähnelt, die beim Ebola Glykoprotein für die toxische Wirkung auf Endothelzellen verantwortlich gemacht werden konnte und die Gefäßpermeabilität entscheidend beeinflusst (Sanchez et al., 2002). Das Auftreten einer DIC ist beim CCHF schon in frühen Phasen zu befürchten und lässt sich anhand der verlängerten Gerinnungszeiten, erniedrigten Spiegel der Gerinnungsfaktoren und erhöhten Konzentrationen von Fibrinabbauprodukten erkennen (Schmaljohn, Nichol., 2007). Eine mögliche Erklärung liefert die Beobachtung, dass Monozyten, Endothelzellen und Hepatozyten das primäre Angriffsziel für CCHFV darstellen (Burt, Swanepoel et al., 1997). Diese Zellen nehmen alle entscheidenden Einfluss auf die Gerinnung und die Gefäßpermeabilität. Als Folge finden sich im mikroskopischen Präparat ausgeprägte perivasale Ödeme (Joubert et al., 1985).

Ähnlich wie beim Lassa-Fieber scheint eine verzögerte Immunantwort mit verspäteter Antikörperproduktion die Ursache für eine unkontrollierte Virämie zu sein, die tödliche Folgen hat. Bei Patienten mit fatalem Ausgang ließ sich selten eine Antikörperantwort nachweisen (Schmaljohn, Nichol, 2007).

#### 1.4.5 **Diagnostik und klinische Parameter**

Eine frühe Diagnosestellung ist mit entscheidend für den Ausgang der Erkrankung. Sie wird aber dadurch erschwert, dass CCHF hauptsächlich in Gegenden auftritt, in denen es nicht die erforderlichen diagnostischen Kapazitäten gibt. Dieses leistet der Wahrscheinlichkeit Vorschub, dass nicht nur dem Patienten die bestmögliche Therapie vorenthalten bleibt, sondern es auch zur nosokomialen Verbreitung kommt.

Als Differentialdiagnosen kommen Rickettsiose, Leptospirose, Borreliose, Meningokokken-Infektionen, Hanta-Virus-Hämorrhagisches-Fieber, Malaria, Gelbfieber, Dengue-Fieber, Omsk-Hämorrhagisches Fieber und Kyasanur-Forest-Disease in Betracht. In Afrika zusätzlich Lassa-Fieber, Ebola- und Marburg-Hämorrhagisches-Fieber (Whitehouse, 2004).

Eine Möglichkeit zur Diagnose ist die Virusanzucht. Dies kann entweder in Vero-Zellkulturen geschehen oder durch die intraperitoneale Infektion von neugeborenen Mäusen. Die Zellkultur liefert schneller Resultate und ist leichter in der Handhabung, dennoch gilt sie als weniger sensitiv als die Inokulation der Versuchstiere (Shepherd, 1986). Beides muss selbstverständlich in L 4 Einrichtungen geschehen. Mit spezifischen Antikörpern kann das Virus in Gehirn und Leber der Mäuse über die indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Mit der RT-PCR lässt sich das Virus auch direkt aus dem Patientenblut nachweisen (Burt et al., 1997, Drosten et al., 2002). Dabei muss beachtet werden, dass sich die Nukleotidsequenzen der Subtypen teilweise so unterscheiden, dass evtl. mehr als ein Oligonukleotidpaar eingesetzt werden muss. Ein ELISA für Antigene und Antikörper ist prinzipiell einsetzbar, aber im Allgemeinen weniger sensitiv. Antikörper werden zudem meist erst um den 7. Tag nach Eintritt der ersten Symptome nachweisbar (Shepherd, 1989).

#### 1.4.6 Therapie & Prophylaxe

Die Therapie des CCHF erfolgt hauptsächlich unterstützend anhand der Symptome. Insbesondere der Flüssigkeitshaushalt und die Gerinnung erfordern eine ständige Kontrolle. Die Wirksamkeit des Virostatikums Ribavirin ist noch nicht durch geeignete Studien belegt, es wird aber sowohl in oraler als auch intravenöser Applikation in frühen Krankheitsstadien als Option betrachtet, den Krankheitsverlauf günstig zu beeinflussen. Eine kleinere Studie in der Türkei ergab, dass die Gabe von Ribavirin einen positiven Einfluss auf die Rekonvaleszenzzeit hat, aber keine signifikante Verkürzung des Krankenhausaufenthalts und Verringerung der Letalität bewirkte. Die Notwendigkeit zur Substitution von Erythrozyten und Blutprodukten wurde ebenfalls nicht verringert (Ozkurt et al., 2005).

Das Therapieschema für den intravenösen Einsatz von Ribavirin wird folgendermaßen empfohlen:

- 30 mg/kg Körpergewicht als Initialdosis
- 16 mg/kg Körpergewicht alle 6 Stunden über vier Tage
- 8 mg/kg Körpergewicht alle 8 Stunden über 6 Tage

*In vitro* hat Rekonvaleszentenplasma eine neutralisierende Wirkung. Ob es allerdings auch die Potenz besitzt den Krankheitsverlauf günstig zu beeinflussen, ist nicht ausreichend erforscht.

Die beste Prophylaxe gegen CCHF-Infektionen ist das Meiden bzw. die Bekämpfung der Zecken mit Repellentien und langer Kleidung. Zur Schlachtung vorgesehene Tiere sollten 10 – 14 Tage vor der Tötung oder ihrem Versand mit Akariziden von Parasiten befreit werden (Flick, Whitehouse, 2005).

Im Krankenhaus und Labor gilt es besondere Vorsichtsmaßnahmen zur Einhaltung der Hygiene zu ergreifen. Der Patient muss streng isoliert werden und sollte nur von Pflegekräften betreut werden, die im Umgang mit hoch-infektiösen Erkrankungen geschult sind. Sämtliche Schutzmöglichkeiten wie Handschuhe, Atemmaske, Schutzbrille und gesonderte Kleidung sollten Anwendung finden. Kontaktpersonen sollten ausfindig gemacht und unter Quarantäne gestellt werden.



## **2    Aufgabenstellung**

Die Darstellung der in der Einleitung beschriebenen Viren und den von ihnen verursachten Symptomen macht deutlich, dass es zur sicheren Diagnose eines VHF und der Identifizierung des Erregers einer spezifischen Diagnostik bedarf. Die Klinik alleine genügt in den meisten Fällen keineswegs, um VHF von anderen Infektionskrankheiten zu unterscheiden, geschweige denn, den Erreger innerhalb der Gruppe von Hämorrhagischen Fieber Viren abzugrenzen. Die verschiedenen Methoden des Nachweises besitzen Stärken und Schwächen, die gegeneinander abgewogen werden müssen.

Die Diagnostik muss nicht nur äußerst sensitiv sein, sondern sollte auch schnell ein Ergebnis liefern, denn nur so lässt sich die Verbreitung der gefährlichen Erreger durch entsprechende hygienische Maßnahmen effizient verhindern. Des Weiteren ist es wünschenswert, dass der Aufwand für das Laborpersonal und dessen Gefährdung während der Durchführung und Auswertung der Tests, so gering wie möglich gehalten wird.

HF treten bevorzugt in Ländern mit niedrigem Gesundheitsbudget auf. Insofern ist es wünschenswert, dass das Nachweisverfahren so günstig wie möglich ist, ohne dass die Qualität des Ergebnisses darunter leidet. Diese Anforderungen werden in erster Linie von der RT-PCR erfüllt, deren Ablauf sich zudem noch hervorragend standardisieren und leicht erlernen lässt.

Ein Ziel bei der Etablierung der RT-PCR war es, die gleichen Temperatur- und Zeiteinstellungen für die Erreger anwenden zu können, damit bei einem Verdachtsfall in einem RT-PCR-Lauf alle in Frage kommenden Viren gleichzeitig abgehandelt und unterschieden werden können. Ein weiterer Schwerpunkt lag in der Einführung einer internen Kontrolle, mit deren Hilfe sich die Richtigkeit des Ergebnisses validieren lässt und vor allem falsch-negative Resultate durch Inhibitoren weitestgehend ausgeschlossen werden können. Hierbei war ein entscheidendes Kriterium, dass die Kontrolle die Sensitivität nicht negativ beeinflusst. Als wünschenswert wurde erachtet, dass die Viren nicht nur qualitativ,

sondern auch quantitativ erfasst werden, um die Prognose der Patienten und auch ihre Infektiösität abschätzen zu können.

Favorisiert war eine one-step RT-PCR Reaktion, bei der sowohl die reverse Transkribierung der viralen RNS in cDNS als auch die Amplifikation des Genabschnitts in dem gleichen Gefäß stattfinden. Im Gegensatz zur two-step RT-PCR muss so nur einmal ein Reaktionsansatz für die Proben erstellt werden und die Einsparung des Pipettierschrittes zwischen RT und PCR verringert nicht nur erheblich die Kontaminationsgefahr, sondern spart auch Arbeitszeit und senkt den Materialaufwand.

Abschließend wurden die Protokolle, sofern dies möglich war, mit denen aus dem *VHF/Variola-PCR Project* verglichen, die bei einem Ringversuch europäischer PCR-Labore verwendet wurden.

### **3     Materialien**

#### **3.1     Chemikalien**

Agarose	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Ethanol	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Glycerin	Merck, Darmstadt
Parafilm	Structure Probe Inc.,
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Serva, Heidelberg
X-Gal	Sigma, Taufkirchen
Phenol	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt

#### **3.2     Geräte**

Biofuge A	Heraeus, Hanau
GeneAmp PCR System 2700	Applied Biosystems, Darmstadt
Megafuge 1.0 R	Kendro, Langenselbold
Microfuge 22 R	Hettich, Tuttlingen
Minifuge T	Heraeus, Hanau
Spectrophotometer DU-40	Beckmann, Frankfurt/Main
LightCycler	Roche, Mannheim

### 3.3 Kits

QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep 8 Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
LightCycler RNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
LightCycler DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Taq PCR Core Kit	Qiagen, Hilden
RiboGreen RNA Quantitation Reagent & Kit	Molecular Probes, Leiden
Riboprobe ® System SP6/T7	Promega, Mannheim
Omniscript Reverse Transkription	Qiagen, Hilden

### 3.4 Oligonukleotide

Name	Sequenz	Erkennt
80F2	5'-ATATAATGATGACTGTTGTTCTTTGTGCA-3'	Lassa-Virus
36E2	5'-ACCGGGGATCCTAGGCATTT-3'	Lassa-Virus
Filo A	5'- ATCGGAATTTTTCTTTCTCATT-3'	Filoviren L-Gen
Filo B	5'-ATGTGGTGGGTTATAATAATCACTGACATG-3'	Filoviren L-Gen
Filo hin	5'-AAAGCMTTCCCHAGCAAYATGATGGT-3'	Filoviren L-Gen
Filo her	5'-GGTGGGYTATAAWAATCACTDACATGCAT-3'	Filoviren L-Gen
CCS	5'-ATGCAGGAACCATTAARTCTTGGGA-3'	CCHFV
CCAs1	5'-CTAATCATATCTgACAACATTTTC-3'	CCHFV
CCAs2	5'-CTAATCATGTCTGACAGCATCTC-3'	CCHFV
CCforSE01	5'-CAAGGGGTACCAAGAAAATGAAGAAGGC-3'	CCHFV
CCrevSE02	5'-GCCACAGGGATTGTTCCAAAGCAGAC-3'	CCHFV
EBOGP1D-fwd	5'-TGGGCTGAAAAYTGCTACAATC-3'	Ebola-Virus GP-Gen
EBOGP1D-rev	5'-CTTTGTGMACATASCGGCAC-3'	Ebola-Virus GP-Gen
MBGGP3-fwd	5'-TTCCCCTTTGGAGGCATC-3'	Marburg-Virus GP-Gen
MBGGP3-rev	5'-GGAGGATCCAACAGCAAGG-3'	Marburg-Virus GP-Gen
Filo-A2_2	5'-AAGCCTTTCCTAGCAATATGATGGT-3'	Filoviren L-Gen
Filo-A2_3	5'-AAGCATTCCCTAGCAATATGATGGT-3'	Filoviren L-Gen
Filo-A2_4	5'-AAGCATTTTCCTAGCAATATGATGGT-3'	Filoviren L-Gen
Filo-B_Ravn	5'-GTGAGGAGGGCTATAAAAGTCACTGACATG-3'	Filoviren L-Gen

Legende:

S = G/C

R = A/G

B = C/G/T

Y = C/T

K = G/T

V = A/C/G

M = A/C

H = A/C/T

N = A/C/G/T

W = A/T

D = A/G/T

Diese Abkürzungen beziehen sich ausschließlich auf die aufgelisteten Oligonukleotide.

**Tabelle 7 Verwendete Oligonukleotide**

Random Decamers

Ambion, Huntingdon

QuantumRNA™ Classic 18S Internal Standard

Ambion, Huntingdon

### 3.5 Sonden

CCprobeSE01	<b>FAM-TGTCAACACAGCAGGGTGCATGTAGAT-TAMRA+p</b>	CCHFV NP-Gen
CCprobeSE02	<b>FAM-TGTAAGCACGGCAGGGTGCATGTAAAT-TAMRA+p</b>	CCHFV NP-Gen
CCprobeSE03	<b>FAM-ACTCCAATGAAGTGGGGGAAGAAGCT-TAMRA+p</b>	CCHFV NP-Gen
EBOGP1DZ-Prb	<b>FAM-CTACCAGCAGCGCCAGACGG-TAMRA+p</b>	Ebola-Virus Zaire GP-Gen
EBOGP1DS-Prb	<b>FAM-TTACCCCCACCGCCGGATG-TAMRA+p</b>	Ebola-Virus Sudan GP-Gen
MBGGP3-Prb	<b>FAM-CGATGGGCTTTCAGGACAGGTGT-TAMRA+p</b>	Marburg-Virus GP-Gen
FAM-EBOSud	<b>FAM-CCGAAATCATCACTCACTIGTITGGTGCCA-TAMRA+p</b>	Ebola-Virus Sudan L-Gen
FAM-EBOg	<b>FAM-CCAAAATCATCACTIGTGTGGTGCCA-TAMRA+p</b>	Ebola-Virus L-Gen
FAM-MBG	<b>FAM-CCTATGCTTGCTGAATTGTGGTGCCA-TAMRA+p</b>	Marburg-Virus L-Gen

**Tabelle 8** Verwendete Sonden (aus VHF/Variola-PCR Project, Panning M et al., 2007)

### 3.6 Vektoren

pGEM – 3Zf(+)

Promega, Mannheim

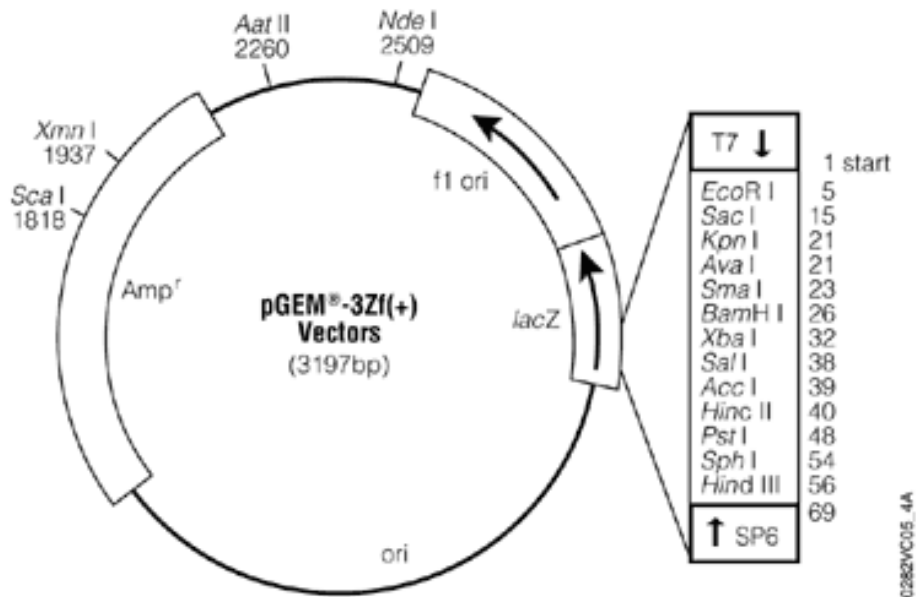


Abb. 3 Aufbau des Vektors pGEM®-3Zf(+) laut Hersteller

pCR 2.1 TOPO

Invitrogen, Karlsruhe

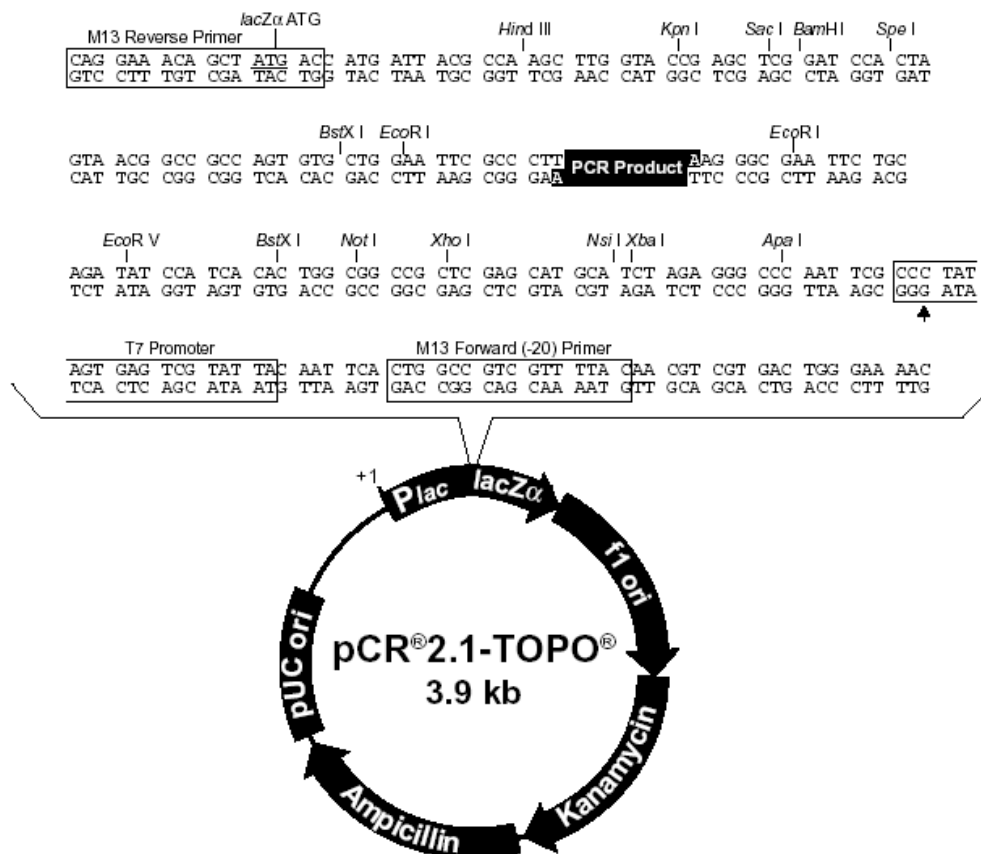


Abb. 4 Aufbau des Vektors pCR®2.1-Topo laut Hersteller

### 3.7 Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Boehringer, Mannheim und New England Biolabs (NEB), Schwalbach bezogen und gemäß den Herstellerangaben eingesetzt.

### 3.8 Bakterien

One Shot® TOP10 E. coli

Invitrogen, Karlsruhe

### 3.9 Medien und Zusätze für die Bakterienkultur

*Luria Bertani* Medium (LB) (1 L): 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl

LB-Agarplatten (1 L): 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Bacto-Agar

Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Pepton	Merck, Darmstadt

### 3.10 Puffer für Agarosegelelektrophorese

50xTAE-Puffer	Tris	242 g/l
	EDTA 0,5 M pH 8,0	100 ml/l
	Eisessig	57,1 ml/l

6xProbenpuffer:	Glycerin	30 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Xylencyanol	0,25 % (w/v)
	gelöst in aqua bidest.	



### 3.11 **DNS-Marker**

2-log Marker

NEB, Schwalbach

low-range Marker

NEB, Schwalbach

## 4 Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Amplifikation der gewünschten DNS-Segmente mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich bei bekannter Sequenz der Matrizen-DNS unter Verwendung sequenzkomplementärer Oligonukleotide (Primer) ein DNS-Fragment definierter Sequenz und Länge zu amplifizieren (Mullis, Faloona, 1987).

#### 4.1.2 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR lässt sich typischerweise in 3 Phasen unterteilen, die sich zyklisch wiederholen:

- Denaturierung der als Doppelstrang-DNS vorliegenden Matrize (Template)
- Anlagerung (Hybridisierung) der komplementären Oligonukleotide (annealing)
- Reduplikation der Einzelstränge durch eine thermostabile DNS-Polymerase

Zur Durchführung der PCR wurde das Taq PCR Core Kit (Quiagen, Hilden) verwendet. In 0,2 ml Reaktionscups wurde der Master-Mix mit der Matrizen-DNS vermischt und dann in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2700) inkubiert. (Genaue Mengenangaben der Reaktionsansätze finden sich an den entsprechenden Stellen im Ergebnisteil)

Initial erfolgte eine 3 minütige Denaturierungsphase bei 94 °C, um sicher zu stellen, dass auch bei größeren Templates mit hohem G/C-Anteil der Doppelstrang komplett aufgeschmolzen ist. Daraufhin folgte die dreiteilige Amplifizierungsphase mit 25 Zyklen, in der anfangs bei 94 °C 30 Sekunden denaturiert wurde, dann für 30 Sekunden bei 55 °C die Anlagerung der Oligonukleotide erfolgte und abschließend für 60 Sekunden bei 72 °C die Duplikation der Ein-

zelstränge stattfand. Am Ende der PCR-Zyklen folgte eine 10 minütige Phase bei 72 °C, in der eventuell nicht komplett synthetisierte Stränge noch vervollständigt werden sollten. Zum Abschluss kühlte der Thermocycler die Reaktionen für unbestimmte Zeit auf 15 °C herunter.

#### 4.1.3 Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese

Die erfolgte Amplifikation der PCR- Fragmente wurde mittels Auftrennung der Fragmente in einem 1 %igem Agarose-Gel und Anfärbung der DNS mit Ethidium-Bromid überprüft. Die negativ geladene DNS wandert im elektrischen Feld zur Anode und legt entsprechend ihrer Größe unterschiedlich weite Strecken zurück. Das Gel wurde in einer Bio-Rad-Minigel-Kammer platziert, die mit 1x TAE-Laufpuffer befüllt war und eine konstante Spannung von 6 V/cm für 40-50 Minuten angelegt. Zuvor wurde die aufzutrennende DNS-Lösung mit einem Laufpuffer (6-fach konzentriert) versetzt. Ein DNS-Marker, der aus DNS-Fragmenten definierter Größe und Menge besteht, diente zur Abschätzung der Größe des Amplifikates (NEB, Frankfurt). Ethidium-Bromid interkaliert irreversibel in doppelsträngiger DNS und fluoresziert bei Beleuchtung mit UV-Licht ( $\lambda=302$  nm) und ermöglicht so die visuelle Begutachtung und Dokumentation unter Zuhilfenahme einer Kamera. Wenn man das gewünschte DNS-Fragment z.B. noch für eine Klonierung benötigte, wurde es unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Für die Elution der DNS wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet.

TAE Puffer (50-fach)

Tris-hydroxymethyl-aminomethan	2 M
Eisessig	57,1 % (v/v)
EDTA	50 mM

aqua bidest.

Lade-Puffer (6-fach)

Glycerin	30 % (w/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylencyanol	0,25 % (w/v)
<i>aqua bidest</i>	

#### 4.1.4 Elution von DNS aus Agarosegelen

Für die Elution von DNS aus Agarosegelen wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Bei diesem Verfahren werden zur DNS-Bindung Silicamembranen verwendet, an welche die DNS in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen bindet. Es ermöglicht die Präparation von DNS-Fragmenten einer Größe von 100 bp bis zu 10 kbp. Die Präparation der DNS aus den Gelen wurde unter Verwendung der mitgelieferten Puffer gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zu je 100 mg des ausgeschnittenen Gels wurden 300 µl Puffer QX1 hinzugegeben und für 10 Minuten bei 50 °C unter mehrmaligem Invertieren, bis die Agarose geschmolzen war, inkubiert. Anschließend wurde diesem Ansatz je ein Gelvolumen Isopropanol zugesetzt, durchmischt und auf eine Silicamembran-Säule gegeben. Die beladene Säule wurde für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die an der Silicamembran gebundene DNS mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Die DNS wurde anschließend mit 50 µl *aqua bidest* eluiert.

Puffer QX1, pH 7,0

NaI	3 M
NaClO <sub>4</sub>	4 M
Tris/HCl	10 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	10 mM

Die Zusammensetzung des Puffers PE wurde von der Herstellerfirma (Qiagen, Hilden) nicht näher spezifiziert.

## 4.2 Isolierung und Quantifizierung von Plasmid-DNS aus Bakterien

### 4.2.1 Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNS

Für die Isolierung von bis zu 20 µg Plasmid-DNS wurde der „QIAprep Spin Plasmid Kit“ bzw. der „QIAprep 8 Miniprep Kit“ verwendet. Diese Kits basieren auf dem Prinzip der alkalischen Lyse mit nachfolgender DNS-Adsorption an einer Silicamembran in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Für die Präparation der Plasmide wurden 5 ml LB-Medium mit einer das Plasmid enthaltenden Bakterienkolonie beimpft und bei 37 °C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. 1,5 ml dieser Übernacht-Kultur wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 5 min bei 13.000 rpm (Biofuge pico, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Bakteriensediment in 250 µl Puffer P1/RNase (0,1 mg/ml) resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 wurden die Zellen lysiert und die DNS denaturiert. Um eine Renaturierung der DNS zu erreichen, wurden weitere 350 µl bzw. 500 µl Puffer N3 zugesetzt. Dieser Ansatz wurde anschließend für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde auf eine Silica-Gel Membran gegeben und für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die nun gebundene Plasmid-DNS wurde zweimal mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Die Elution wurde mit 50 µl *aqua bidest* durchgeführt. Die Lagerung erfolgt bei – 20 °C.

### 4.2.2 Isolierung großer Mengen Plasmid-DNS

Für die Präparation von 300 µg bis zu 500 µg Plasmid-DNS wurde das „QIAfilter Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Dazu wurden 100 ml einer über Nacht Bakterienkultur 15 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Bakteriensediment in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Dazu wurden 10 ml Puffer P2 hinzugegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Puffer P3 dazu gegeben, der gesamte Ansatz in eine QIAfilter-Kartusche überführt und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde unter Druck durch den Filter gepresst und so von unlöslichen Bestandteilen, wie bakteriellen Proteinen, chromosomaler DNS etc. befreit. Das klare Lysat wurde auf eine, zuvor mit Puf-

fer QBT äquilibrierten, Silica-Gel Membran-Säule gegeben. Die nun an der Membran gebundene Plasmid-DNS wurde anschließend zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNS erfolgte mit 15 ml Puffer QF. Die Fällung der DNS geschah unter Zugabe von 0,7 VT Isopropanol und einer 30 minütigen Zentrifugation bei 15.000 rpm (Rotor: SW 28) und 4 °C. Das so erhaltene DNS-Präzipitat wurde anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die luftgetrocknete DNS wurde in *aqua bidest* aufgenommen und bei –20 °C gelagert.

Puffer P1, pH 8,0

Tris/HCl	50 mM
EDTA	10 mM
Rnase A	100 µg/ml

Puffer P2

NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

Puffer P3, pH 5,5

Kaliumacetat	3 M
--------------	-----

Puffer QBT, pH 7,0

NaCl	750 mM
MOPS	50 mM
Isopropanol	15 % (v/v)
Triton <sup>®</sup> X-100	0,15 % (w/v)

Puffer QC, pH 7,0

NaCl	1 M
MOPS	50 mM
Isopropanol	15 % (v/v)

Puffer QF, pH 8,5

NaCl	1,25 M
Tris/HCl	50 mM
Isopropanol	15 % (v/v)

Die Zusammensetzung der Puffer N3 und PE wurden von der Firma Qiagen, Hilden nicht näher erläutert.

## 4.3 **Positives Kontrollmaterial**

Inaktivierte Zellkulturüberstände von Vero-Zellen im Puffer AVL/ Ethanol, die mit den Virusstämmen Ebola-Zaire Eckron oder Gabon infiziert waren, wurden von Dr. Markus Eickmann; Institut für Virologie Marburg zur Verfügung gestellt.

### 4.3.1 **Gewinnung viraler RNS aus Serum unter Verwendung des QIAamp Viral RNA Mini Kit**

630 µl der Lösung wurden auf eine QIAamp-Säule gegeben und für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend in ein sauberes 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 500 µl Puffer AW1 wurde erneut für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und es folgte 3-minütiges Zentrifugieren mit 500 µl Puffer AW2 bei maximaler Geschwindigkeit (14.000 rpm).

In einem frischen Reaktionsgefäß wurde die gebundene RNS mit 60 µl RNase-freiem Wasser nach 1 Minute bei Raumtemperatur und Zentrifugation bei 8000 rpm eluiert. Aliquotiert wurde die RNS bei –80 °C gelagert.



#### 4.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNS-Lösungen

Zur Bestimmung der Konzentration von DNS wird die Beziehung des Lambert Beer'schen Gesetzes angewendet. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Es gelten folgende Näherungswerte für die photometrische Konzentrationsbestimmung in *aqua bidest* (Lichtweg: 1 cm):

$OD_{260} = 1$  entspricht 50 µg doppelsträngiger DNS pro ml, oder

$OD_{260} = 1$  entspricht 40 µg einzelsträngiger DNS pro ml, oder

$OD_{260} = 1$  entspricht 20 µg Oligonukleotide pro ml

Die Reinheit der DNS wurde durch eine weitere photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt, bei dieser absorbieren Proteine. Der Quotient aus der Extinktion 260 : Extinktion 280 sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, ansonsten sollte ein weiterer Reinigungsschritt angeschlossen werden.

#### 4.5 Quantifizierung von RNS im LightCycler mit RiboGreen® RNA Quantitation Kit

In dieser Arbeit sollte die Nachweisgrenze der Methoden bestimmt werden. Dazu musste die Konzentration der gewählten Standards bestimmt werden. Das gängigste Verfahren zur Feststellung dieser Konzentrationen ist die photometrische Bestimmung. Nachteil dieser Methode ist die Anfälligkeit für fehlerhafte Messungen wegen Verunreinigungen der Lösung durch z.B. Proteine und freie Nukleotide.

Die Benutzung eines fluoreszierenden Reagenz, das an RNS bindet, erlaubt eine viel sensitivere und spezifischere Messung. Laut Hersteller übertrifft die Sensitivität des RiboGreen® RNA Quantitation Reagenz die von Ethidiumbromid 200-fach und die einer Absorptionsmessung von UV-Licht sogar 1000-fach. Die Detektion von nur 1 ng/ml RNS wird so ermöglicht.

Das Exzitationsmaximum von an RNS gebundenem RiboGreen Reagenz beträgt ~500 nm und das Emmisionsmaximum liegt bei 525 nm. Der lineare Bereich zur Quantifizierung umfasst 3 Zehnerpotenzen von 1 ng/ml bis 1 µg/ml RNS. Je nachdem, ob man hohe oder niedrige Konzentrationen erwartet muss das Reagenz unterschiedlich verdünnt werden:

Für den Bereich von 20 ng/ml bis 1 µg/ml 200-fach

Für den Bereich von 1 ng/ml bis 50 ng/ml 2000-fach

Da der Farbstoff auch an DNS bindet sollte vor der Messung ein DNase-Verdau und eine Entfernung der DNS-Fragmente stattfinden.

Zuerst wurden die Proben mit dem im Kit enthaltenen Puffer (1x) verdünnt. Da der Puffer in 20x Konzentration geliefert wird, muss er vorher entsprechend mit *aqua bidest* verdünnt werden. Eine Standard-Verdünnungsreihe aus der im Kit bereitgestellten RNS mit 1x Puffer wurde erstellt und anschließend 5 µl Probe bzw. Standard in die vorgekühlten Kapillaren pipettiert. Als Referenz diente eine Kapillare mit 5 µl 1x Puffer. Als nächstes wurde das RiboGreen Reagenz in ei-

nem Eppendorfcup 200-fach verdünnt und mit Aluminium umwickelt, da das Reagenz sehr empfindlich auf Licht reagiert.

In alle Kapillaren wurden 5 µl des verdünnten Fluoreszenzfarbstoffes pipettiert und der Ansatz bei 3000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert.

In der RealTime-Fluorimeter Einstellung des Lightcyclers wurde die Fluoreszenz bei 30 °C im Channel F1 gemessen.

Die Umrechnung von µg/ml in pmol erfolgte per Hand mit der Formel:

$$\text{pmol (ssRNS)} = \mu\text{g (ssRNS)} \times 2,941 / N_b$$

$N_b$  = Anzahl der Nukleotide

## 4.6 Restriktion von DNS

Zur Kontrolle, ob das gewünschte DNS-Fragment (Insert) in den Vektor erfolgreich ligiert wurde bietet sich neben einer Kontroll-PCR ein Verdau des Konstrukts mittels Restriktionsendonukleasen an. Die Restriktionsenzyme werden so ausgewählt, dass sie kurz vor und kurz hinter der Insertionsstelle schneiden aber keine Schnittstelle im Insert vorhanden ist. Für den Verdau eines 10 µl Ansatzes wurden 5 µl der gewonnenen Mini-Präp DNS (~1 µg) mit 1 µl des Restriktionsenzymys sowie 1 µl des zugehörigen 10-fach Puffers versetzt und mit 3 µl *aqua bidest* auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und danach 60 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Auftrennung und Sichtbarmachung der entstehenden Fragmente erfolgte im Anschluss mittels Agarosegelelektrophorese.

#### 4.7 Phenolextraktion und Ethanolfällung von DNS und RNS

Für die Reinigung von wässrigen DNS/RNS-Lösungen wurden selbige mit dem entsprechend gleichen Volumen eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25/24/1) versetzt und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Um die Phasen wieder vollständig zu trennen wurde 2 Minuten mit 14000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde anschließend abgenommen und nochmals mit einem volumenäquivalent Chloroform-Isoamylalkohol (24/1) gemischt. Auch hier wurde nach gründlichem Durchmischen 2 Minuten mit 14000 rpm zentrifugiert und der wässrige Überstand in ein sauberes Cup überführt.

Die DNS in der Lösung wurde sie durch Zugabe von Roger-Rapid Reagenz und 100 %igem Ethanol nach Anleitung des Herstellers gefällt und durch 10 minütiges zentrifugieren bei 14000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und danach mit 70 %igem Ethanol das verbleibende Salz ausgewaschen. Nach weiteren 5 Minuten in der Zentrifuge bei 14000 rpm wurde der Alkohol vorsichtig abpipettiert und die DNS luftgetrocknet. Nach vollständiger Verdunstung des Ethanols konnte das DNS-Pellet in 20 µl *aqua bidest* eluiert und aliquotiert bei –20 °C gelagert werden.

Wenn RNS gereinigt werden sollte, wurde nach dem DNase-Verdau analog extrahiert. Zum Fällern, bei einem Ausgangsvolumen von 100 µl, wurden 50 µl einer 7,5 M Ammoniumacetatlösung und 250 µl 100 %igen Ethanols eingesetzt. Der Ansatz wurde nach gründlicher Durchmischung 30 Minuten bei –80 °C gelagert und anschließend 20 Minuten mit 14000 rpm zentrifugiert. Auch hier folgte eine Waschung mit 70 %igem Ethanol und nach der Lufttrocknung des Pellets die Resuspendierung in 50 µl *aqua bidest*. Die Aliquots wurden abschließend bei –80 °C gelagert.

## 4.8 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurden 50 ml LB Medium mit einem Milliliter einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur angeimpft. Der Ansatz wurde anschließend auf einem Schüttler bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5, d.h. einer Zellzahl von ca.  $4 \times 10^7$  bis  $7 \times 10^7$  Zellen/ml, inkubiert. Nachdem die gewünschte Zellzahl erreicht war, wurde der Ansatz für 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Bakteriensediment in 5 ml TSS-Puffer resuspendiert. Die in TSS-Puffer resuspendierten *E. coli* Zellen wurden anschließend noch einmal für 20 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie für die Transformation verwendet wurden.

LB-Medium	siehe 3.8
-----------	-----------

TSS-Puffer, pH 6,5

LB-Medium	85 % (w/v)
-----------	------------

Polyethylenglykol 800	10 % (w/v)
-----------------------	------------

DMSO	5 % (w/v)
------	-----------

MgCl <sub>2</sub>	50 mM
-------------------	-------

Der TSS-Puffer wurde vor der Verwendung steril filtriert.

## 4.9 Transformation

Für die Transformation wurden 200 µl kompetente *E. coli* Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 0,001 bis 0,5 pmol Vektor-DNS vermischt. Zur Bindung der Plasmid-DNS an die Bakterienzellen, wurde der gesamte Ansatz für 40 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 90 Sekunden auf 42 °C erhitzt, um die Aufnahme der DNS in die Zelle zu ermöglichen. Danach wurden die Zellen für 3 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit 800 µl LB-Medium versetzt. Zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz wurde der Transformationsansatz für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um plasmidtragende Klone zu selektionieren, wurden 100 µl und 900 µl des Ansatzes auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

LB-Medium	siehe 3.12
-----------	------------

LB-Agar<sup>Amp,Kan</sup>

LB-Medium

Bacto-Agar	15,0 g/l
------------	----------

Ampicillin	0,1 g/l
------------	---------

Kanamycin	0,025 g/l
-----------	-----------

#### 4.10 Ligation von PCR-Produkten mit TOPO TA Cloning-Kit

Eine komfortable und schnelle Methode zum Ligieren eines gewünschten DNS-Fragmentes in einen Vektor liefert die Firma Invitrogen. Das Kit enthält einen bereits liniarisierten pCR 2.1 Vektor mit einem 3'-Thymidin Überhang und einer kovalent gebundenen Topoisomerase I. PCR-Produkte, die mit Taq-Polymerase synthetisiert wurden besitzen einen 3' Adenosin Überhang.

Dies erlaubt eine direkte Ligierung ohne vorhergehenden Restriktionsverdau oder weiteren Einsatz von Enzymen. Das PCR-Produkt ligiert dabei in das LacZ-Gen des Vektors und ermöglicht so später eine weiß/blau Selektionierung der E. coli Kolonien. Das Kit wurde nach Anleitung des Herstellers für chemisch kompetente E. coli wie in Tabelle 9 angegeben verwendet:

PCR-Produkt (gereinigt)	3 µl
Salz-Lösung	1 µl
Steriles Wasser	1 µl
TOPO pCR2.1 Vektor	1 µl
Gesamtvolumen	6 µl

**Tabelle 9** Pipettieransatz zur Legierung mit TOPO pCR<sup>®</sup> 2.1

Das Gemisch wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Währendessen wurden die im Kit enthaltenen One Shot<sup>®</sup> TOP10 E. coli auf Eis aufgetaut und mit 2 µl des Vektoransatzes gemischt. Nach 20-25 minütiger Lagerung auf Eis wurde der Ansatz für 30 Sekunden in den auf 42 °C erwärmten Heizblock gestellt. Anschließend wurden 250 µl SOC-Medium bei Raumtemperatur hinzu pipettiert und die Cups danach für 60 Minuten in den Schüttler bei 37 °C gestellt.

Um plasmidtragende Klone zu selektionieren und erkennen zu können wurden 50 µl der Bakterien auf kanamycinhaltigen (1/1000) Agarplatten ausplattiert, die zuvor mit je 40 µl IPTG und X-gal bestrichen wurden. Nach Inkubation der Platten bei 37 °C über Nacht waren weiße und blaue Kolonien sichtbar. Die weißen Kolonien wurden in kanamycinhaltigem LB-Medium weiter kultiviert.



## 4.11 In vitro Transkription

Bei der *in vitro* Transkription wird DNS mit einer DNS-abhängigen RNS-Polymerase umgeschrieben. Hierbei kommen z.B. die SP6, T7 oder T3 Polymerase zum Einsatz, die aus Phagen stammen. Man macht sich bei diesen Enzymen zu Nutze, dass sie an einer bestimmten DNS-Sequenz, dem Promoter, mit der Transkription beginnen. Diese Promoter sind bei vielen Plasmiden bereits in günstiger Position vorhanden. Deshalb bedarf es zur *in vitro* Transkription nur noch der Linearisierung des Vektors mittels Restriktionsverdau an einer so gewählten Stelle, dass zwischen Promotor und der Schnittstelle möglichst nur der für die Transkription gewünschte Abschnitt liegt. So ist es möglich ein run-off Transkript zu erstellen, wobei die Polymerase diesen Abschnitt kontinuierlich übersetzt. Bei dieser Arbeit wurde das Riboprobe<sup>®</sup> System SP6/T7 der Firma Promega verwendet. Vorgegangen wurde bei der Verwendung nach den Angaben des Herstellers für hohe RNS-Ausbeute.

Transcription Optimized 5x Buffer	20 µl
100 mM DTT	10 µl
Recombinant RNasin ® Ribonuclease Inhibitor	100 U
rATP, rGTP, rCTP, rUTP (je 2,5 mM – durch Mischen der 10 mM Stammlösungen zu gleichen Teilen)	20 µl
Linearisierte Plasmid-DNS	2 µl
SP6, T3, T7 RNS Polymerase	40 U
Nuclease freies Wasser	ad 100 µl

**Tabelle 10 Pipettieransatz für *in vitro* Transkription für hohe RNS-Ausbeute**

Der Ansatz wurde 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation musste die Matrizen-DNS wieder entfernt werden. Um dies zu erreichen wurde eine Unit pro Mikrogramm Vorlagen-DNS der im Kit enthaltenen DNase hinzugegeben und weitere 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach folgte die Aufreinigung und Konzentration der RNS wie unter 4.7 beschrieben.

## 4.12 RT-PCR

In der Molekularbiologie existieren zahlreiche Methoden zur Analyse von RNS wie Northern Blot, in-situ-Hybridisierung usw. Alle diese Methoden haben den Nachteil, dass sie sehr zeitaufwendig und arbeitsintensiv sind. Insbesondere bei schwachen Transkripten oder viraler RNS, die häufig in geringer Ausgangskonzentration vorliegen, kann es zu falsch negativen Ergebnissen kommen, wenn die Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Die Adaption der PCR-Technologie an RNS als Matrize führte zu zahlreichen neuen Erkenntnissen und zu einer sensitiveren Diagnostik. Es ist sogar möglich mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der RNS zu ziehen und somit Aussagen über Genexpression bzw. Viruslast zu machen. Für die Amplifikation ist es allerdings im ersten Schritt notwendig die RNS in DNS umzuschreiben, weil die im zweiten Schritt eingesetzte herkömmliche DNS-Polymerase nicht RNS direkt als Matrize verwenden kann. Hierfür bieten sich mehrere Enzyme an, die als Reverse Transkriptasen oder RNS-abhängige DNS-Polymerasen bezeichnet werden und unterschiedlicher Herkunft sein können, wie z.B. *Moloney murine leukemia virus* (MMLV), *avian myeloblastosis virus* (AMV) und *Thermus thermophilus* (Tth). Neben dem Einsatz unterschiedlicher Enzyme gibt es auch hinsichtlich der Reaktionsführung verschiedene Möglichkeiten für eine RT-PCR:

**Two-Step RT-PCR** (in zwei Reaktionsgefäßen): Hierbei wird zunächst separat der RT-Schritt mit einem relativ kleinen Volumen durchgeführt. Dies hat den Vorteil, dass man die Reaktionsbedingungen optimal auf die verwendete Reverse Transkriptase einstellen kann. Ausserdem kommt es so nicht zu einer Inhibition der RT-Reaktion durch Zusätze die erst im zweiten Schritt benötigt werden. Nach dem RT-Schritt wird eine herkömmliche PCR durchgeführt. Nachteil dieser Verfahrensweise ist eine erhöhte Kontaminationsgefahr, da ein zusätzlicher Pipettierschritt notwendig ist.

**One-Step RT-PCR** (in einem Reaktionsgefäß): Aus oben genanntem Grund ist es sinnvoll, die gesamte Reaktion in einem Gefäß ohne Umfüllen auszuführen. Hierbei bietet sich z.B. das QIAGEN OneStep RT-PCR Kit als anwenderfreund-

liches Produkt an, das eine effiziente und spezifische RT-PCR mit jeglicher RNS als Ausgangsmaterial ermöglicht. Das Kit enthält optimal aufeinander abgestimmte Komponenten, die es erlauben, Reverse Transkription und PCR in einem Reaktionsgefäß durchzuführen. Nach dem gleichen Prinzip funktionieren auch die entsprechenden RT-Kits für den Light-Cycler™. Der maßgebliche Unterschied besteht lediglich in der Zugabe von SYBR-Green zur sofortigen Fluoreszenzmarkierung der neu amplifizierten DNS-Abschnitte und Messung nach jedem Zyklus.

#### **4.12.1 Einstellen der Oligonukleotidkonzentrationen**

##### **4.12.1.1 Random Decamers**

Die Random Decamers dienen zur sequenzunabhängigen Einleitung des reversen Transkriptase-Schrittes. Geliefert werden sie in der Konzentration von 50 µM. Für ihren Einsatz in der PCR werden sie auf 10 µM eingestellt.

##### **4.12.1.2 Herstellung des Oligonukleotidgemisches für den internen Standard**

Das Oligonukleotidgemisch für den internen Standard besteht aus zwei gebrauchsfertig gelieferten Lösungen mit je einem Primerpaar. Die erste Lösung enthält die Oligonukleotide für die Amplifikation des 18S-Genomabschnitts, die zweite die so genannten Competimer, die um die gleiche Sequenz kompetieren, aber durch eine Modifikation das Ablesen der Polymerase verhindern. So wird sichergestellt, dass die Amplifikation der 18S-RNS nicht die Vervielfältigung des viralen Genoms beeinträchtigt. Am effizientesten hat sich das Mischungsverhältnis Primer/Competimer von 4/6 herausgestellt.

##### **4.12.1.3 Einstellen der virusspezifischen Oligonukleotide**

Die lyophilisiert gelieferten Oligonukleotidsequenzen (Tabelle 7, S. 43) werden für die Lagerung (Stock) mit RNase- freiem Wasser gelöst, so dass die Konzentration 100 µM beträgt. Die Oligonukleotidpaare vom Lassa-, Marburg- und Ebola-Virus werden zu gleichen Teilen gemischt und auf eine Endkonzentration von je 20 µM eingestellt. (Beispiel: 10 µl Oligonukleotid1 + 10 µl Oligonukleotid2 + 30 µl H<sub>2</sub>O) Bei den Oligonukleotiden für CCHFV müssen zuerst die beiden Rückprimer (CCAs1, CCAs2) zu gleichen Teilen gemischt werden. So erhält

man eine Lösung, in der jedes Oligonukleotid für sich eine Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  hat. Diese Lösung wird analog zu den anderen oben beschriebenen spezifischen Oligonukleotidpaaren eingesetzt.

#### 4.12.2 RT-PCR auf dem GeneAmp 2700

Durchführung: Zuerst werden Matrizen-RNS, Oligonukleotidlösungen, dNTP-Mix, 5x QIAGEN OneStep RT-PCR Puffer und RNase-freies Wasser auf Eis aufgetaut.

Gemäß untenstehender Tabelle 11 wurde ein Master-Mix erstellt und in die bereitgestellten und beschrifteten PCR-Reaktionsgefäße pipettiert:

Komponente	Volumen in $\mu\text{l}$	Konzentration
Quiagen OneStep RT-PCR Puffer	4,00	5x
dNTP-Mix	0,80	10 mM von jedem
Random Decamers	2,00	10 $\mu\text{M}$
18S Internal Standard	2,00	4/6 Primer/Competimer
Spezifisches Primerpaar (vorgemischt)	1,00	Je 20 $\mu\text{M}$
RNase-Inhibitor	0.25	40 U
Enzymmix	0,80	nicht spezifiziert
H <sub>2</sub> O (RNase frei)	7,15	-
Template/Probe	2,00	-
<b>GESAMT</b>	20,00	

**Tabelle 11 Pipettieransatz für die RT-PCR auf dem GeneAmp 2700**

Nach Zugabe der Matrizen-RNS wurden die PCR-Cups sofort verschlossen und in den Tabelle 12 entsprechend vorprogrammierten Thermocycler gestellt:

Programm	Temperatur / °C	Zeit	Zyklen
RT	37	5 min	1
	50	30 min	1
Aktivierung / Hot-Start	95	15 min	1
Denaturierung	94	15 sec	30
Annealing	56	15 sec	
Elongation	72	30 sec	
Finale Elongation	72	5 min	1
Hold	15	∞	1
<b>Gesamtzeit</b> (incl. Heiz- & Kühlzeiten)	ca. 1 h 50 min		

**Tabelle 12 Programmierung für RT-PCR auf GeneAmp 2700**

Die PCR-Produkte wurden anschließend unter UV-Licht nach Auftrennung im Agarose-Gel analysiert.

#### 4.12.3 Real-Time PCR auf dem Roche Light-Cycler

Eine Weiterentwicklung des PCR-Verfahrens gelang der Firma Roche mit der Einführung des Light-Cyclers. Anders als bei der herkömmlichen PCR erlaubt die Benutzung von Glaskapillaren und die Beimischung eines Fluoreszenzfarbstoffes in den Reaktionsansatz eine Messung der Fluoreszenz nach jedem Amplifikationszyklus. Mit der zugehörigen Software kann man nach Ablauf der PCR für jede Probe den so genannten Crossing-Point berechnen, mit dem es möglich wird im Vergleich zu Standards mit bekannter Konzentration, die Ausgangsmenge des amplifizierten Produktes zu bestimmen. Außerdem ermöglicht eine abschließende kontinuierliche Fluoreszenzmessung bei linear ansteigender Temperatur die Bestimmung des spezifischen Schmelzpunktes eines Amplifikats. Dieser Wert kann zur Sicherung der Spezifität der PCR herangezogen werden, da jede Gensequenz entsprechend der Verteilung der kodierenden Nukleotide einen spezifischen Schmelzpunkt aufweist. Dieser ist allerdings abhängig von der Ionenkonzentration im Reaktionsansatz, weshalb man bei der Erstellung des Mastermixes sehr sorgsam arbeiten sollte, um vergleichbare Werte zu erhalten.

Ein Mastermix wurde wie in Tabelle 13 aufgelistet erstellt:

Komponente	Volumen in µl	Konzentration
RNA Master SYBR-Green	7,5	2,7x
Spezifisches Primerpaar (vorgemischt)	2,00	Je 20 µM
Mn(OAc) <sub>2</sub>	1	50 mM
H <sub>2</sub> O (RNase frei)	7,5	-
Template/Probe	2,00	-
<b>GESAMT</b>	20,00	

**Tabelle 13** Pipettieransatz für den Mastermix zur RT-PCR auf dem LightCycler™

Die Glaskapillaren wurden in die dafür vorgesehenen Kühlblöcke platziert und 18 µl des Mastermixes pipettiert. Nach Zugabe der RNS wurden die Kapillaren sofort verschlossen und nach ca. 30-sekündigem Zentrifugieren bei 3000 rpm befand sich der Reaktionsansatz in die Spitze der Kapillar. Umgehend wurden die Proben in den zuvor wie folgt programmierten Light-Cycler gestellt und das Programm (Tabelle 14) gestartet.

PCR-Schritt	Temperatur °C	Dauer	Aufzeichnung	Temp.Trans °C/s
<u>RT-Reaktion:</u>	61	20 min	keine	20,0
<u>Denaturierung:</u>	95	30 sec	keine	20,0
<u>Amplifikation Pre (10x):</u>	95	5 sec	keine	20,0
(Step Size –1 °C)	60	5 sec	keine	20,0
	72	25 sec	keine	2,0
<u>Amplifikation (40x):</u>	95	5 sec	keine	20,0
	56	10 sec	keine	20,0
	72	30 sec	einfach	2,0
Schmelzkurve	95	5 sec	keine	20,0
	65	15 sec	keine	20,0
	95	00:00	kontinuierlich	0,1

**Tabelle 14** Programmierung für RT-PCR auf dem LightCycler™

Die Auswertung erfolgte direkt anschließend mit der LightCycler™-Software anhand der Crossing-Point Berechnung und der Schmelzpunkte. Zusätzlich wurden 10 µl des RT-PCR-Ansatzes in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

#### 4.12.3.1 PCR mit Plasmid-DNS auf dem LightCycler™

Für die PCR mit Plasmid-DNS wurde der Roche FastStart DNA Master SYBR Green I Kit verwendet. Folgender Mastermix wurde verwendet:

Komponente	Volumen in µl	Konzentration
DNA Master SYBR-Green I	2	10x
Spezifisches Primerpaar (vorgemischt)	2	Je 20 µM
H <sub>2</sub> O (RNase frei)	14	-
Template/Probe	2	-
<b>GESAMT</b>	20	

*Tabelle 15 Pipettieransatz PCR mit Plasmid-DNS auf dem LightCycler™*

Die Zeit- und Temperatureinstellungen waren die gleichen wie bei der RT-PCR, nur der RT-Schritt entfiel und das Programm „Amplifikation Pre“ wurde durch eine 3-minütige Denaturierungsphase ersetzt.

#### 4.12.4 Quantitative Marburg-Virus-RT-PCR auf dem LightCycler™ mit QuantiTect SYBR Green RT-PCR, Qiagen

Der Mastermix wurde wie folgt erstellt:

Komponente	Volumen in µl	Konzentration
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix	10,0	2x
Spezifisches Primerpaar (vorgemischt)	2,0	Je 20 µM
QuantiTect RT Mix	0,2	0,2 µl/Ansatz
H <sub>2</sub> O (RNase frei)	5,8	-
Template/Probe	2,0	-
<b>GESAMT</b>	20,00	

*Tabelle 16 Pipettieransatz für Marburg-Virus-RT-PCR auf dem LightCycler™ mit QuantiTect SYBR Green RT-PCR, Qiagen*

Bei den Amplifikationsparametern wurde bis auf das Einfügen einer 15 minütigen Aktivierungsphase (hot-start) für die DNS-Polymerase keine Änderungen vorgenommen.

PCR-Schritt	Temperatur °C	Dauer	Aufzeichnung	Temp.Trans °C/s
RT-Reaktion:	61	20 min	<i>keine</i>	20,0
Aktivierung / hot start	95	15 min	<i>Keine</i>	20,0
Denaturierung:	95	30 sec	<i>keine</i>	20,0
Amplifikation Pre (10x):	95	5 sec	<i>keine</i>	20,0
(Step Size –1 °C)	60	5 sec	<i>keine</i>	20,0
	72	25 sec	<i>keine</i>	2,0
Amplifikation (40x):	95	5 sec	<i>keine</i>	20,0
	56	10 sec	<i>keine</i>	20,0
	72	30 sec	einfach	2,0
Schmelzkurve	95	5 sec	<i>keine</i>	20,0
	65	15 sec	<i>keine</i>	20,0
	95	00:00	kontinuierlich	0,1

***Tabelle 17 Programmierung für Marburg-Virus-RT-PCR auf dem LightCycler™ mit QuantiTect SYBR Green RT-PCR, Qiagen***

#### 4.12.5 Filoviren Real-Time RT-PCR mit Sonden (Panning et al., 2007)

Bei den Filoviren wurde eine Real-Time RT-PCR mit Sonden eingesetzt, die für den jeweiligen Subtyp spezifisch sind. Als Template diente in vitro transkribierte RNS des L-Gens von Marburg-, Ebola-Sudan- und Ebola-Zaire-Virus. Der Mastermix wurde unter Zuhilfenahme des Qiagen OneStep RT-PCR Kits erstellt:



Reagenz	µl / Reaktion	Konzentration Ausgangslösung	Konzentration Gemisch	Bemerkungen
5x Qiagen OneStep RT-PCR Puffer	5,0	5x	1x	Enthält 12,5 mM MgCl <sup>2</sup>
dNTP Mix	1,0	10 mM	0,4 mM	Jedes dNTP 10 mM
Primer Filo-A2_2	0,5	10 mM	0,2 µM	Siehe 3.4
Primer Filo-A2_3	0,5	10 mM	0,2 µM	Siehe 3.4
Primer Filo-A2_4	0,5	10 mM	0,2 µM	Siehe 3.4
Primer Filo-B	0,75	10 mM	0,3 µM	Siehe 3.4
Primer Filo-B_Ravn	0,75	10 mM	0,3 µM	Siehe 3.4
Probe FAM-EBOSud	0,175	10 mM	0,07 µM	Siehe 3.5
Probe FAM-EBOg	0,175	10 mM	0,07 µM	Siehe 3.5
Probe FAM-MBG	0,175	10 mM	0,07 µM	Siehe 3.5
Bovines Serum Albumin	1,0	1000 µg/ml	40 µg/ml	
QIAGEN RT-PCR Enzym-Mix	1,0			
DEPC Wasser	10,48			
Gesamtvolumen Mastermix	22,0			
Matrizen RNS	3,0			
Gesamtvolumen	25,0			

**Tabelle 18** Pipettieransatz für Filoviren-Real-Time-RT-PCR mit Sonden (Panning et al., 2007)

Der Lightcycler wurde wie folgt programmiert:

PCR-Schritt	Temperatur °C	Dauer	Acquisition	Temp.Trans °C/s
RT-Reaktion:	50	30 min	<i>keine</i>	20,0
HotStart Taq Activation:	95	15 min	<i>keine</i>	20,0
Amplifikation (45x):	95	15 sec	<i>keine</i>	20,0
	52	25 sec	<i>einfach</i>	20,0
	72	30 sec	<i>keine</i>	20,0
Cooling	30	30 sec	<i>keine</i>	20,0

**Tabelle 19** Programmierung für Filoviren-Real-Time-RT-PCR mit Sonden (Panning et al., 2007)

#### 4.12.6 Ansatz zum Vergleich der Lassa Virus GPC-Gen RT-PCR

Der Mastermix wurde wie in folgender Tabelle 20 aufgelistet erstellt:

Reagenz	µl / Reaktion	Konzentration Ausgangslösung	Konzentration Gemisch	Bemerkungen
5x Qiagen OneStep RT-PCR Puffer	5,0	5x	1x	Enthält 12,5 mM MgCl <sup>2</sup>
dNTP Mix	1,0	10 mM	0,4 mM	Jedes dNTP 10 mM
Primer OWS_0001+	0,5	10 mM	0,5 µM	Siehe 3.4
Primer OWS_1000A-	0,5	10 mM	0,5 µM	Siehe 3.4
QIAGEN RT-PCR Enzym-Mix	0,8			
DEPC Wasser	9,4			
Gesamtvolumen Mastermix	17,0			
Matrizen RNS	3,0			
Gesamtvolumen	20,0			

**Tabelle 20** Pipettieransatz für Vergleich der Lassa Virus GPC-Gen RT-PCR

# Programmierung des Cyclers

Programm	Temperatur / °C	Zeit	Zyklen
RT	50	30 min	1
Aktivierung / Hot-Start	95	15 min	1
Denaturierung	95	20 sec	45
Annealing	55	30 sec	
Elongation	72	60 sec	
Finale Elongation	72	10 min	1
Hold	15	∞	1

***Tabelle 21 Programmierung für Vergleich der Lassa Virus GPC-Gen RT-PCR***

#### 4.13 **Enzymatische Sequenzierung von DNS**

Es wurde das Verfahren der enzymatischen Sequenzierung von DNS nach Sanger et al. (1977) verwendet. Es wurden 100 ng der Plasmid-DNS und je 10 pmol Vorwärts- oder Rückwärtsprimer auf 16 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt und in eine Sequenzierplatte mit 96 Vertiefungen gegeben. Die PCR-Reaktion, die Aufreinigung und die Sequenzierung erfolgte durch DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit und den MegaBACE 500 CE DNS Sequenzierer (Fa. Amersham Biosciences).

## 4.14 Vermeidung von Kontaminationen

Zur Vermeidung von Kontaminationen muss man zunächst an die Kontaminationsquellen denken:

- Aerosolbildung: Durch Zentrifugation, Lüftungsanlagen, offene Proben und PCR-Gefäße.
- Verschleppungen von Nukleinsäure: Durch kontaminierte Pipetten, Verbrauchsmaterial, Reagenzien, Handschuhe, Kleidung etc.

Daher wurden folgende Maßnahmen eingehalten:

- häufig verwendete Reagenzien und Probenmaterial wurden aliquotiert.
- Nur autoklavierte Reagenzien, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden verwendet.
- Manuelle Schritte wurden so weit wie möglich reduziert, z.B. Vermeidung von Umfüllen der Proben mittels einer Pipette in andere Gefäße.
- In regelmäßigen Abständen wurden Geräte, Pipetten, Kammern dekontaminiert. (Autoklaviert, UV-Licht, Pyrokarbonat-Behandlung)
- Gestopfte Pipetten-Spitzen wurden verwendet.
- Gefäße wurden langsam und kontrolliert geöffnet.
- Auf räumliche Trennung geachtet:
  - Platz 1: Ansetzen der Reaktionsmischung (Master-Mix) kurz vor der Verwendung
  - Platz 2: Herstellung der Verdünnungsreihe und Zugabe der RNS-DNS-Matrize.
  - Platz 3: Durchführung der Analyse mit PCR-Produkten
- In jedem PCR-Lauf wurde eine Negativ-Kontrolle, d.h. ohne DNS-, RNS-Matrize, eingesetzt, die als letzte Probe bearbeitet wurde.

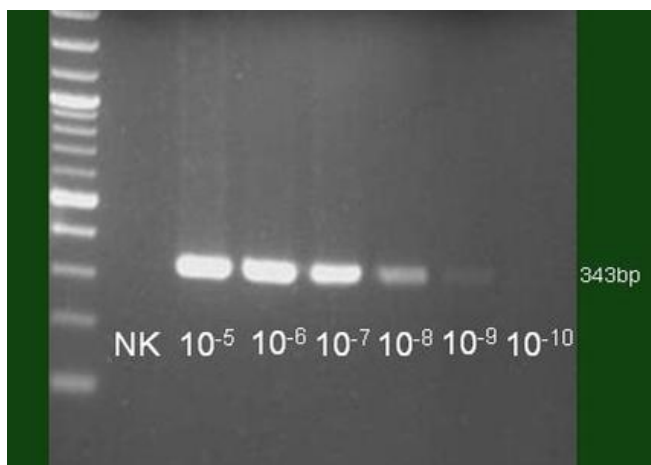
## 5 Ergebnisse

### 5.1 **Etablierung einer RT-PCR für Lassa-Viren mit interner Kontrolle**

Für die RT-PCR der Lassa-Virus-RNS wurde das Oligonukleotidpaar 80F2 und 36E2 verwendet. Seine Tauglichkeit zur Erkennung und Amplifikation eines Abschnittes aus der Glykoproteinsequenz wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Demby et al., 1994, Drosten et al., 2002). Diese 334 Basenpaare lange Sequenz war bereits von Herrn Amir Reza Vahhabzadeh im Rahmen seiner Diplomarbeit in den Vektor pGEM 3Zf(+) ligiert worden und wurde mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Der Vektor wurde in einer Bakterienkultur vervielfältigt und anschließend mit dem Restriktionsenzym EcoR1 linearisiert. Nach *in vitro*-Transkription mit der SP6-Polymerase erfolgte die Erstellung einer logarithmischen Verdünnungsreihe. Eine PCR ohne RT-Schritt mit unverdünntem Probenmaterial war negativ und stellte damit sicher, dass keine DNS mehr vorhanden war, die das Ergebnis der RT-PCR beeinflussen konnte.

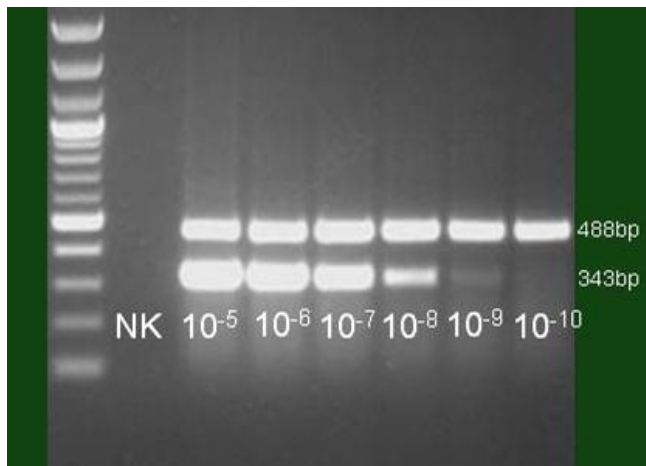
Daraufhin wurde die RT-PCR nach dem in 4.12.2 angegebenen Protokoll durchgeführt und erbrachte einen Nachweis bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-9}$ . (Abb. 5)



**Abb. 5 Nachweis von Lassa-Virus RNS mittels RT-PCR.**

Die *in vitro* transkribierte Lassa-RNS wurde logarithmisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungen in die RT-PCR eingesetzt. Erwartete Größe des Amplifikats: 343 bp. Als Negativkontrolle diente Wasser (NK). Zur Abschätzung der Größe der amplifizierten DNS wurde der „2-Log Marker“ mit aufgetrennt. Aufgetragen wurden 10 µl des RT-PCR Ansatzes.

Die Multiplex-RT-PCR erfolgte mit denselben Verdünnungsstufen unter Zugabe des 18S-Oligonukleotidgemisches und 18S-RNS. Auch hier gelang ein Nachweis der Lassa-RNS bis zur Verdünnung  $10^{-9}$ . (Abb. 6)



**Abb. 6 Nachweis Lassa-Virus RNS + 18S-RNS mittels Multiplex-RT-PCR**

Die in vitro transkribierte Lassa-RNS wurde logarithmisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungen in die RT-PCR eingesetzt. Erwartete Größe des Amplifikats: 343 bp. 18S-RNS wurde als interne Kontrolle zugegeben (erwartete Größe 488 bp). Als Negativkontrolle diente Wasser (NK). Zur Abschätzung der Größe der amplifizierten DNS wurde der „2-Log Marker“ mit aufgetrennt. Aufgetragen wurden 10 µl des RT-PCR Ansatzes.

## 5.2 Etablierung einer RT-PCR für Marburg- und Ebola-Viren mit interner Kontrolle

### 5.2.1 Oligonukleotiddesign für Filoviren

Aus den Gen-Datenbanken im Internet wurden alle zur Verfügungen stehenden Sequenzen des L-Proteins von Marburg- und Ebola-Viren zusammengetragen und verglichen.

Subtyp (Strain):	GI
<b>Ebola-</b>	
Reston	15823608
Reston (Pennsylvania)	22671623
Sudan	1041213
Zaire	10313991
Zaire (Mayinga)	11761745
Zaire (1995)	33860540
<b>Marburg-</b>	
Lake Victoria (M/S-Africa/Johannesburg)	34304751
Lake Victoria (Musoke/pp3)	40388387

Es wurden Regionen gesucht, bei denen alle möglichst homologe Nukleotidsequenzen zeigten und die Oligonukleotide entsprechend zusammengestellt. Dabei ist zu beachten, dass das Rückoligonukleotid negativkomplementär zu der Sequenz sein muss. An Stellen, wo die Sequenz der Virusstämme nicht die gleichen Nukleotide aufwiesen, wurden entsprechende Wobbles in die Oligonukleotidsequenz eingefügt, wobei besonderes Augenmerk darauf lag, dass an dem Ende, an dem die Transkription von der Polymerase fortgeführt wird keine Wobbles eingesetzt werden sollten.



Als Ausgang für Filohin wurde der folgende markierte Abschnitt gewählt:

```
gi|10313991|ref|NC_002549.1|      GATGGTCTTGCT AAAGCATTTCCTAGCAATATGATGGT AGTTACGGAACG
TGAGCAAAAAGAAAGCTTAT 13396
gi|33860540|gb|AY354458.1|      GATGGTCTTGCT AAAGCATT TCCTAGCAATATGATGGT AGTTACGGAACG
TGAGCAAAAAGAAAGCTTAT 13397
gi|15823608|dbj|AB050936.1|     GATGGACTGGCT AAGGCCTT CCCCAGTAACATGATGGT AGTAACTGAACG
TGAACAAAAAGAGAGCCTTC 13363
gi|22671623|gb|AF522874.1|     GATGGACTGGCC AAGGCCTT CCCCAGTAACATGATGGT AGTAACTGAACG
TGAACAAAAAGAGAGCCTTC 13365
gi|1041213|gb|U23458.1|EVU2345 GATGGTTTGGCT AAAGCCTT TCCAAGCAACATGATGGT TGTCACAGAGAG
GGAACAAAAGGAGAGCCTCC 1897
gi|13489275|ref|NC_001608.2|    GATGGACTAGCA AAAGCATT CCCTAGCAACATGATGGT TGTACTGAGAG
GGAACAGAAAGAAGCATTAT 13303
gi|40388387|gb|AY430365.1|     GATGGACTGGCA AAAGCATT CCCTAGTAACATGATGGT TGTCAGTGAAG
GGAACAGAAAGAAGCATTAT 13305
gi|34304751|gb|AY358025.2|     GATGGACTAGCA AAAGCATT CCCTAGTAACATGATGGT TGTCAGTGAAG
GGAACAGAAAGAAGCTTTAT 13324
```

nach Einsetzen der Wobbles entstand die 26 Basen lange Sequenz:

AAAGCmTTCCChAGCAAyATGATGGT

Als Ausgang für Filorück wurde der folgende markierte Abschnitt gewählt:

```
gi|10313991|ref|NC_002549.1|    TAT ATGCATGTCAGTGATTATTATAATCCACC ACATAACCTCACACTGGA 13646
gi|33860540|gb|AY354458.1|    TAT ATGCATGTCAGTGATTATTATAATCCACC ACATAACCTCACACTGGA 13647
gi|15823608|dbj|AB050936.1|    TAC ATGCATGTAAGTGATTATTATAATCCGCC TCACAATGTTAATCTTAG 13613
gi|22671623|gb|AF522874.1|    TAC ATGCATGTAAGTGATTATTATAATCCGCC TCACAATGTTAATCTTAG 13615
gi|1041213|gb|U23458.1|EVU2345 TAC ATGCATGTTAGTGATTATTATAACCCACC ACATAATGTAACCTTTAGA 2147
gi|13489275|ref|NC_001608.2|    TAT ATGCATGTCAGTGATTTTATAGCCCACC ACATTGCGTAACAGAAGA 13553
gi|40388387|gb|AY430365.1|    TAT ATGCATGTCAGTGACTTTTATAGCCCACC ACATTGTGTGACAGAAGA 13555
gi|34304751|gb|AY358025.2|    TAT ATGCATGTCAGTGATTTTATAGCCCACC ACATTGTGTGACAGAAGA 13574
```

nach Einsetzen der Wobbles entstand die 29 Basen lange Sequenz:

GGTGGGyTATAAwAATCACTdACATGCAT

Wobbles:

S = G/C	H = A/C/T
Y = C/T	D = A/G/T
M = A/C	B = C/G/T
W = A/T	V = A/C/G
R = A/G	N = A/C/G/T
K = G/T	

Alle Oligonukleotidsequenzen wurden anschließen *in silico* auf der Webseite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi> eingegeben und die Suchergebnisse verglichen.

Der „Score“ beschreibt den Grad der Übereinstimmung (je höher, desto besser) und der E-Wert die Signifikanz des Ergebnisses (je kleiner, desto besser)

Relevante Ergebnisse für FiloA sind fett markiert:

	Score	E-Wert
<a href="#">gi 2546940 emb X67110.1 EBLPROTG</a> Zaire Ebola virus L gene encode	<b>36.2</b>	<b>0.85</b>
<a href="#">gi 12666261 emb AL357522.10 </a> Human DNA sequence from clone RP	<b>36.2</b>	0.85
<a href="#">gi 10141003 gb AF086833.2 </a> Zaire Ebola virus strain Mayinga, com	<b>36.2</b>	<b>0.85</b>
<a href="#">gi 37811877 gb AY330644.1 AY330643S2</a> Helicobacter pylori stra...	<b>36.2</b>	0.85
<a href="#">gi 33860540 gb AY354458.1 </a> Zaire ebolavirus strain Zaire 1995, c	<b>36.2</b>	<b>0.85</b>
<a href="#">gi 23630482 gb AY142960.1 </a> Zaire Ebola virus strain Mayinga subt	<b>36.2</b>	<b>0.85</b>
<a href="#">gi 21702647 gb AF499101.1 </a> Zaire Ebola virus strain Mayinga, com	<b>36.2</b>	<b>0.85</b>
<a href="#">gi 11761745 gb AF272001.1 </a> Zaire Ebola virus strain Mayinga, com	<b>36.2</b>	<b>0.85</b>
<a href="#">gi 70778700 gb AC102677.9 </a> Mus musculus chromosome 5, clone RP24	<b>36.2</b>	0.85
<a href="#">gi 52693787 dbj AB190937.1 </a> Helicobacter pylori cagA gene for...	<b>36.2</b>	0.85
<a href="#">gi 18767431 gb AC108096.2 </a> Homo sapiens chromosome 5 clone RP11-	<b>36.2</b>	0.85
<a href="#">gi 18369911 gb AC009174.3 </a> Homo sapiens chromosome 5 clone RPCI-	<b>36.2</b>	0.85
<a href="#">gi 17386254 gb AC092276.2 </a> Homo sapiens chromosome 5 clone CTD-2	<b>36.2</b>	0.85
<a href="#">gi 46091580 dbj AB120425.1 </a> Helicobacter pylori genes for cag..	<b>36.2</b>	0.85

Relevante Ergebnisse für FiloB sind fett markiert:

	Score	E-Wert
<a href="#">gi 52352969 gb AY729654.1 </a> Sudan ebolavirus strain Gulu, complet	<b>52.0</b>	<b>4e-05</b>
<a href="#">gi 2546940 emb X67110.1 EBLPROTG</a> Zaire Ebola virus L gene encodi	<b>52.0</b>	<b>4e-05</b>
<a href="#">gi 10141003 gb AF086833.2 </a> Zaire Ebola virus strain Mayinga, com	<b>52.0</b>	<b>4e-05</b>
<a href="#">gi 33860540 gb AY354458.1 </a> Zaire ebolavirus strain Zaire 1995, c	<b>52.0</b>	<b>4e-05</b>
<a href="#">gi 23630482 gb AY142960.1 </a> Zaire Ebola virus strain Mayinga subt	<b>52.0</b>	<b>4e-05</b>
<a href="#">gi 21702647 gb AF499101.1 </a> Zaire Ebola virus strain Mayinga, com	<b>52.0</b>	<b>4e-05</b>
<a href="#">gi 1041213 gb U23458.1 EVU23458</a> Sudan Ebola virus Maleo strai...	<b>52.0</b>	<b>4e-05</b>
<a href="#">gi 11761745 gb AF272001.1 </a> Zaire Ebola virus strain Mayinga, com	<b>52.0</b>	<b>4e-05</b>
<a href="#">gi 450908 emb Z29337.1 MVVIRPR</a> Marburg virus (Popp) NP, VP35, V	<b>44.1</b>	<b>0.010</b>
<a href="#">gi 296962 emb X68494.1 MAVSPAB</a> Marburg Virus genomic RNA of L ge	<b>44.1</b>	<b>0.010</b>

<a href="#">gi 34304751 gb AY358025.2 </a>	<b>Marburg virus strain M/S.Africa/Jo...</b>	<b><a href="#">44.1</a></b>	<b>0.010</b>
<a href="#">gi 26024135 gb AC091114.11 </a>	Homo sapiens chromosome 8, clone RP1	<a href="#">38.2</a>	0.59
<a href="#">gi 24371361 gb AF252829.4 </a>	Homo sapiens chromosome 8 clone RP...	<a href="#">38.2</a>	0.59
<a href="#">gi 24462301 gb AC104319.3 </a>	Homo sapiens chromosome 8 clone RP...	<a href="#">38.2</a>	0.59
<a href="#">gi 75812984 gb AC160864.9 </a>	Mus musculus 10 BAC RP23-425N2 (Ro...	<a href="#">36.2</a>	2.3
<a href="#">gi 40388379 gb AY430366.1 </a>	<b>Lake Victoria marburgvirus strain ...</b>	<b><a href="#">36.2</a></b>	<b>2.3</b>
<a href="#">gi 40388387 gb AY430365.1 </a>	<b>Lake Victoria marburgvirus strain ...</b>	<b><a href="#">36.2</a></b>	<b>2.3</b>
<a href="#">gi 68248531 gb DQ088379.1 </a>	Homo sapiens synuclein, alpha (non...	<a href="#">36.2</a>	2.3
<a href="#">gi 17981667 gb AC104288.4 </a>	Drosophila melanogaster X BAC RP98...	<a href="#">36.2</a>	2.3
<a href="#">gi 15982591 gb AC093759.3 </a>	Homo sapiens BAC clone RP11-67M1 from	<a href="#">36.2</a>	2.3
<a href="#">gi 11118351 gb AF163864.1 AF163864</a>	Homo sapiens SNCA isoform ...	<a href="#">36.2</a>	2.3
<a href="#">gi 22831463 gb AE003420.2 </a>	Drosophila melanogaster chromosome...	<a href="#">36.2</a>	2.3
<a href="#">gi 5579274 gb AC007372.4 AC007372</a>	Homo sapiens chromosome 14 ...	<a href="#">36.2</a>	2.3
<a href="#">gi 6672063 emb AL049837.4 CNS0000F</a>	Human chromosome 14 DNA se...	<a href="#">36.2</a>	2.3
<a href="#">gi 77543426 gb DQ217792.1 </a>	<b>Lake Victoria marburgvirus - Musoke f</b>	<b><a href="#">36.2</a></b>	<b>2.3</b>
<a href="#">gi 541780 emb Z12132.1 MVREPCYC</a>	<b>Marburg virus genes for vp35,...</b>	<b><a href="#">36.2</a></b>	<b>2.3</b>
<a href="#">gi 2950396 emb AL022017.1 DMC190E7</a>	Drosophila melanogaster cosmi	<a href="#">36.2</a>	2.3
<a href="#">gi 332178 gb M92834.1 MRVMBGL</a>	<b>Marburg virus L protein (mbgl) gen</b>	<b><a href="#">36.2</a></b>	<b>2.3</b>

Relevante Ergebnisse für Filohin sind fett markiert, die Suche wurde mit den entsprechenden Basen für die Wobbles durchgeführt:

	Score	E
<a href="#">gi 78064651 gb DQ205415.1 </a>	<b><a href="#">52.0</a></b>	<b>3e-05</b>
<a href="#">gi 78064649 gb DQ205414.1 </a>	<b><a href="#">52.0</a></b>	<b>3e-05</b>
<a href="#">gi 450908 emb Z29337.1 MVVIRPR</a>	<b><a href="#">52.0</a></b>	<b>3e-05</b>
<a href="#">gi 296962 emb X68494.1 MAVSPAB</a>	<b><a href="#">52.0</a></b>	<b>3e-05</b>
<a href="#">gi 40388379 gb AY430366.1 </a>	<b><a href="#">44.1</a></b>	<b>0.006</b>
<a href="#">gi 40388387 gb AY430365.1 </a>	<b><a href="#">44.1</a></b>	<b>0.006</b>
<a href="#">gi 1041213 gb U23458.1 EVU23458</a>	<b><a href="#">44.1</a></b>	<b>0.006</b>
<a href="#">gi 34304751 gb AY358025.2 </a>	<b><a href="#">44.1</a></b>	<b>0.006</b>
<a href="#">gi 2546940 emb X67110.1 EBLPROTG</a>	<b><a href="#">44.1</a></b>	<b>0.006</b>
<a href="#">gi 10141003 gb AF086833.2 </a>	<b><a href="#">44.1</a></b>	<b>0.006</b>
<a href="#">gi 33860540 gb AY354458.1 </a>	<b><a href="#">44.1</a></b>	<b>0.006</b>
<a href="#">gi 23630482 gb AY142960.1 </a>	<b><a href="#">44.1</a></b>	<b>0.006</b>
<a href="#">gi 21702647 gb AF499101.1 </a>	<b><a href="#">44.1</a></b>	<b>0.006</b>

<a href="#">gi 11761745 gb AF272001.1 </a>	Zaire Ebola virus strain Mayinga, com	<a href="#">44.1</a>	0.006
<a href="#">gi 78064639 gb DQ205409.1 </a>	Zaire ebolavirus isolate chiro EKA...	<a href="#">44.1</a>	0.006
<a href="#">gi 77543426 gb DQ217792.1 </a>	Lake Victoria marburgvirus - Musoke f	<a href="#">44.1</a>	0.006
<a href="#">gi 541780 emb Z12132.1 MVREPCYC</a>	Marburg virus genes for vp35,...	<a href="#">44.1</a>	0.006
<a href="#">gi 332178 gb M92834.1 MRVMBGL</a>	Marburg virus L protein (mbgl) gen	<a href="#">44.1</a>	0.006
<a href="#">gi 15823608 dbj AB050936.1 </a>	Ebola virus strain Reston genomic RN	<a href="#">38.2</a>	0.38
<a href="#">gi 22671623 gb AF522874.1 </a>	Reston Ebola virus strain Pennsylvani	<a href="#">38.2</a>	0.38
<a href="#">gi 31746474 emb BX469932.7 </a>	Mouse DNA sequence from clone RP2...	<a href="#">38.2</a>	0.38
<a href="#">gi 55247455 gb AY769362.1 </a>	Reston ebolavirus strain Pennsylvania	<a href="#">38.2</a>	0.38
<a href="#">gi 11991375 emb AL355351.18 </a>	Human DNA sequence from clone RP...	<a href="#">36.2</a>	1.5
<a href="#">gi 52352969 gb AY729654.1 </a>	Sudan ebolavirus strain Gulu, complet	<a href="#">36.2</a>	1.5
<a href="#">gi 10141003 gb AF086833.2 </a>	Zaire Ebola virus strain Mayinga, com	<a href="#">36.2</a>	1.5
<a href="#">gi 71274374 gb AC156610.10 </a>	Mus musculus chromosome 7, clone RP2	<a href="#">36.2</a>	1.5
<a href="#">gi 28015038 gb AC105105.10 </a>	Homo sapiens chromosome 18, clone...	<a href="#">36.2</a>	1.5

Relevante Ergebnisse für Filorück sind fett markiert, die Suche wurde mit den entsprechenden Basen für die Wobbles durchgeführt:

		Score	E
<a href="#">gi 52352969 gb AY729654.1 </a>	Sudan ebolavirus strain Gulu, complet	<a href="#">58.0</a>	6e-07
<a href="#">gi 1041213 gb U23458.1 EVU23458</a>	Sudan Ebola virus Maleo strai...	<a href="#">58.0</a>	6e-07
<a href="#">gi 450908 emb Z29337.1 MVVIRPR</a>	Marburg virus (Popp) NP, VP35, V	<a href="#">58.0</a>	6e-07
<a href="#">gi 296962 emb X68494.1 MAVSPAB</a>	Marburg Virus genomic RNA of L ge	<a href="#">58.0</a>	6e-07
<a href="#">gi 34304751 gb AY358025.2 </a>	Marburg virus strain M/S.Africa/Jo...	<a href="#">58.0</a>	6e-07
<a href="#">gi 40388379 gb AY430366.1 </a>	Lake Victoria marburgvirus strain ...	<a href="#">50.1</a>	1e-04
<a href="#">gi 40388387 gb AY430365.1 </a>	Lake Victoria marburgvirus strain ...	<a href="#">50.1</a>	1e-04
<a href="#">gi 77543426 gb DQ217792.1 </a>	Lake Victoria marburgvirus - Musoke f	<a href="#">50.1</a>	1e-04
<a href="#">gi 10141003 gb AF086833.2 </a>	Zaire Ebola virus strain Mayinga, com	<a href="#">50.1</a>	1e-04
<a href="#">gi 33860540 gb AY354458.1 </a>	Zaire ebolavirus strain Zaire 1995, c	<a href="#">50.1</a>	1e-04
<a href="#">gi 23630482 gb AY142960.1 </a>	Zaire Ebola virus strain Mayinga subt	<a href="#">50.1</a>	1e-04
<a href="#">gi 21702647 gb AF499101.1 </a>	Zaire Ebola virus strain Mayinga, com	<a href="#">50.1</a>	1e-04
<a href="#">gi 11761745 gb AF272001.1 </a>	Zaire Ebola virus strain Mayinga, com	<a href="#">50.1</a>	1e-04
<a href="#">gi 541780 emb Z12132.1 MVREPCYC</a>	Marburg virus genes for vp35,...	<a href="#">50.1</a>	1e-04
<a href="#">gi 332178 gb M92834.1 MRVMBGL</a>	Marburg virus L protein (mbgl) gen	<a href="#">50.1</a>	1e-04
<a href="#">gi 15823608 dbj AB050936.1 </a>	Ebola virus strain Reston genomic RN	<a href="#">46.1</a>	0.002
<a href="#">gi 22671623 gb AF522874.1 </a>	Reston Ebola virus strain Pennsylvani	<a href="#">46.1</a>	0.002

<a href="#">gi 55247455 gb AY769362.1 </a>	<b>Reston ebolavirus strain Pennsylvania</b>	<a href="#">46.1</a>	<b>0.002</b>
<a href="#">gi 21930229 gb AC098645.3 </a>	Papio anubis clone RP41-470J23, compl	<a href="#">42.1</a>	0.035
<a href="#">gi 2546940 emb X67110.1 EBLPROTG</a>	<b>Zaire Ebola virus L gene encodi</b>	<a href="#">42.1</a>	<b>0.035</b>
<a href="#">gi 77543426 gb DQ217792.1 </a>	<b>Lake Victoria marburgvirus - Musoke f</b>	<a href="#">42.1</a>	<b>0.035</b>
<a href="#">gi 23592204 gb AC124175.2 </a>	Mus musculus BAC clone RP23-183N18 fr	<a href="#">40.1</a>	0.14
<a href="#">gi 49609491 emb BX950851.1 </a>	Erwinia carotovora subsp. atroseptic	<a href="#">40.1</a>	0.14
<a href="#">gi 16756316 gb AC097454.2 </a>	Homo sapiens BAC clone RP11-2F17 from	<a href="#">38.2</a>	0.54
<a href="#">gi 24418077 gb AC120120.2 </a>	Homo sapiens chromosome 5 clone RP11-	<a href="#">38.2</a>	0.54

Der *in silico* Vergleich zeigt, dass die neuen Oligonukleotide nicht nur deutlich spezifischer für die filovirale L-Proteinsequenz sind, sondern dabei auch noch mehr Subtypen und Stämme erfassen.

Die beiden Filoviren wurden bei den Arbeiten parallel behandelt und werden deshalb an dieser Stelle zusammen aufgeführt. Isolierte cDNS Sequenzen des L-Proteins beider Viren wurden von Prof. Dr. Stephan Becker dankenswerterweise zur Verfügung gestellt. In einer PCR wurden die benötigten Teilsequenzen amplifiziert und das Amplifikat aus dem Agarosegel unter UV-Lichtkontrolle ausgeschnitten. Im „pCR2.1“ Vektor inseriert konnte die extrahierte DNS in „TOP10“ E. coli vervielfältigt werden. Ein analytischer Restriktionsverdau mit EcoR1 konnte bestätigen, dass die Sequenzen eingefügt wurden. Nach der Plasmidextraktion in großem Maßstab erfolgte die Linearisierung des Konstruktes über einen Restriktionsverdau mit BamH1 und anschließend die *in vitro* - Transkription mit der T7-Polymerase als „run-off“-Transkript. Die aufgereinigte RNS wurde mit einer konventionellen PCR auf DNS-Rückstände getestet und in einer logarithmischen Verdünnungsreihe in der RT-PCR eingesetzt. Sowohl die Sequenz des Ebola-Virus L-Proteins als auch die des Marburg-Virus konnten im Gel als 290 bp großes Amplifikat bis zur Verdünnung  $10^{-9}$  nachgewiesen werden. (Abb. 7, Abb. 8, Abb. 9, Abb. 10)

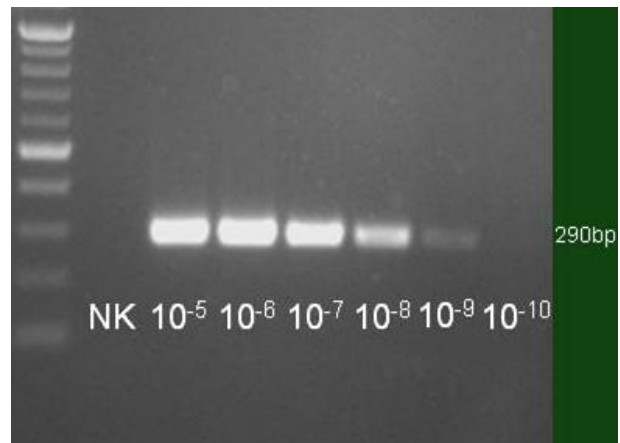


**Abb. 7 Nachweis Ebola-L RNS mittels RT-PCR**

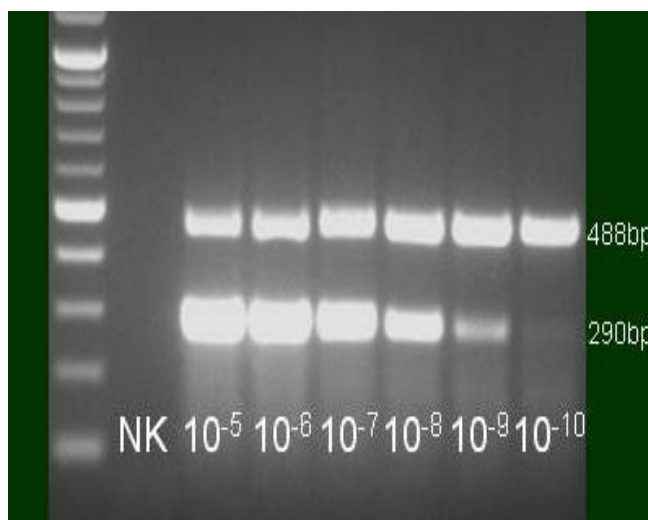
Die in vitro transkribierte Ebola-RNS wurde logarithmisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungen in die RT-PCR eingesetzt. Erwartete Größe des Amplifikats: 290 bp. Als Negativkontrolle diente Wasser (NK). Zur Abschätzung der Größe der amplifizierten DNS wurde der „2-Log Marker“ mit aufgetrennt. Aufgetragen wurden 10 µl des RT-PCR Ansatzes.

**Abb. 8 Nachweis Marburg-L RNS mittels RT-PCR**

Die in vitro transkribierte Marburg-RNS wurde logarithmisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungen in die RT-PCR eingesetzt. Erwartete Größe des Amplifikats: 290 bp. Als Negativkontrolle diente Wasser (NK). Zur Abschätzung der Größe der amplifizierten DNS wurde der „2-Log Marker“ mit aufgetrennt. Aufgetragen wurden 10 µl des RT-PCR Ansatzes.



Es folgte die RT-PCR mit denselben Verdünnungsstufen und den für die interne Kontrolle notwendigen Zusätzen. In beiden Versuchsreihen wurde kein Sensitivitätsverlust beobachtet und die Nachweisgrenze verblieb bei  $10^{-9}$ . (Abb. 9, Abb. 10)



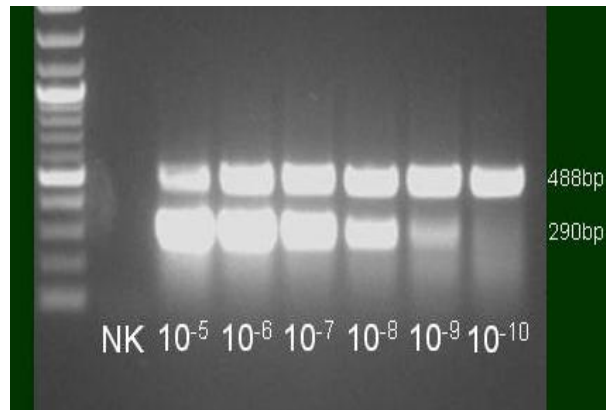
**Abb. 9 Nachweis Ebola-L RNS + 18S-RNS mittels Multiplex-RT-PCR**

Die in vitro transkribierte Ebola-RNS wurde logarithmisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungen in die RT-PCR eingesetzt. Erwartete Größe des Amplifikats: 290 bp. 18S-RNS wurde als interne Kontrolle zugegeben (erwartete Größe 488 bp). Als Negativkontrolle diente Wasser (NK). Zur Abschätzung der Größe der amplifizierten DNS wurde der „2-Log Marker“ mit aufgetrennt. Aufgetragen wurden 10 µl des RT-PCR Ansatzes.



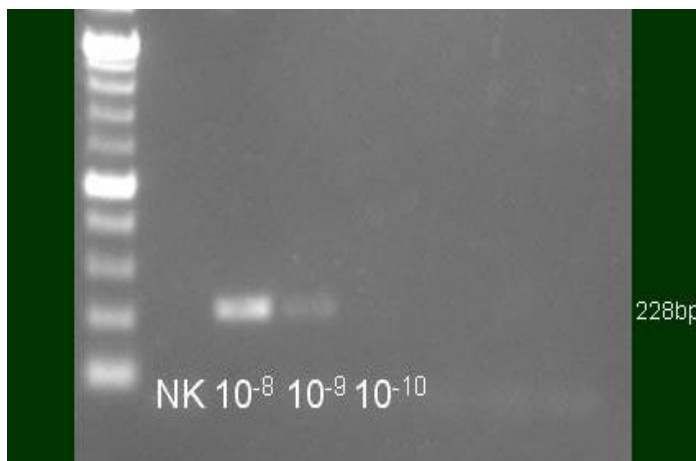
**Abb. 10 Nachweis Marburg-L  
RNS + 18S-RNS mittels Multi-  
plex-RT-PCR**

Die *in vitro* transkribierte Marburg-RNS wurde logarithmisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungen in die RT-PCR eingesetzt. Erwartete Größe des Amplifikats: 290 bp. 18S-RNS wurde als interne Kontrolle zugegeben (erwartete Größe 488 bp). Als Negativkontrolle diente Wasser (NK). Zur Abschätzung der Größe der amplifizierten DNS wurde der „2-Log Marker“ mit aufgetrennt. Aufgetragen wurden 10 µl des RT-PCR Ansatzes.



### 5.3 Etablierung einer RT-PCR für Krim-Kongo Hä- morrhagisches Fieber Virus mit interner Kontrol- le

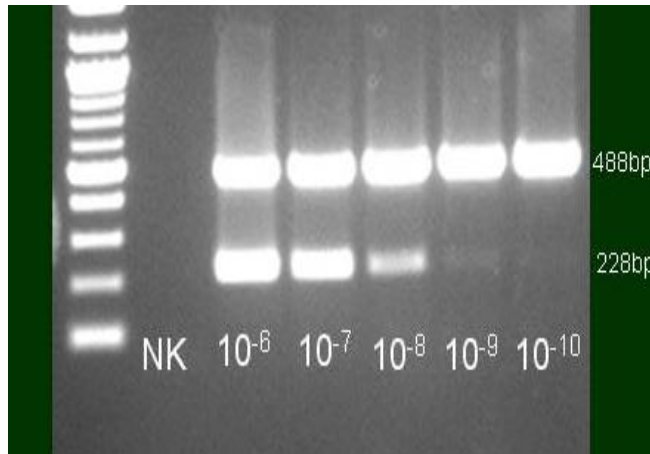
Im Rahmen der Diplomarbeit von Herrn Amir Reza Vahhabzadeh wurde eine mit den Oligonukleotiden F2 und F3 amplifizierte Teilsequenz des CCHFV Nukleoproteins (NP; U88416) in den Vektor pCR2.1 kloniert. Dieses Konstrukt wurde mir freundlicherweise zu Verfügung gestellt. Eine konventionelle PCR stellte sicher, dass die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide CCS und CCAs1/2 sich innerhalb dieser Sequenz anlagern. In einer „Top10“ *E. coli* Bakterienkultur wurde das Plasmid vervielfältigt und isoliert. Mit dem Restriktionsenzym BamH1 konnte es linearisiert werden und in der *in vitro* -Transkription mit T7-Polymerase als Matrize Verwendung finden. Die transkribierte RNS wurde logarithmisch verdünnt und die Nachweisgrenze der RT-PCR ohne interne Kontrolle ermittelt. Sie lag bei  $10^{-9}$ . (Abb. 11) Aus konzeptionellen Gründen sind diesmal nur die Verdünnungsstufen  $10^{-8}$  und  $10^{-9}$  aufgetragen.



**Abb. 11 Nachweis  
CCHFV-NP RNS mittels RT-PCR**

Die *in vitro* transkribierte CCHF-RNS wurde logarithmisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungen in die RT-PCR eingesetzt. Erwartete Größe des Amplifikats: 228 bp. Als Negativkontrolle diente Wasser (NK). Zur Abschätzung der Größe der amplifizierten DNS wurde der „2-Log Marker“ mit aufgetrennt. Aufgetragen wurden 10 µl des RT-PCR Ansatzes

Bei der anschließenden Integrierung der internen Kontrolle mit 18S-RNS und den entsprechenden Oligonukleotiden zeigte sich wie bei den Versuchen zuvor keine Verringerung der Sensitivität. (Abb. 12)



**Abb. 12 Nachweis CCHF-NP RNS + 18S-RNS mittels Multiplex-RT-PCR**

Die *in vitro* transkribierte CCHF-RNS wurde logarithmisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungen in die RT-PCR eingesetzt. Erwartete Größe des Amplifikats: 228 bp. 18S-RNS wurde als interne Kontrolle zugegeben (erwartete Größe 488 bp). Als Negativkontrolle diente Wasser (NK). Zur Abschätzung der Größe der amplifizierten DNS wurde der „2-Log Marker“ mit aufgetrennt. Aufgetragen wurden 10µl des RT-PCR Ansatzes.

#### 5.4 Quantitative „real-time“ Diagnostik auf dem Roche™ LightCycler®

Es sind bereits Protokolle publiziert worden, die beschreiben, wie eine quantitative Diagnostik der hämorrhagischen Fieber Viren durchgeführt werden kann (Drosten et al., 2002). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass sie relativ aufwendig ist und zusätzlich weitere Gerätschaften zur Vorbereitung der Proben und zur Amplifikation benötigt werden.

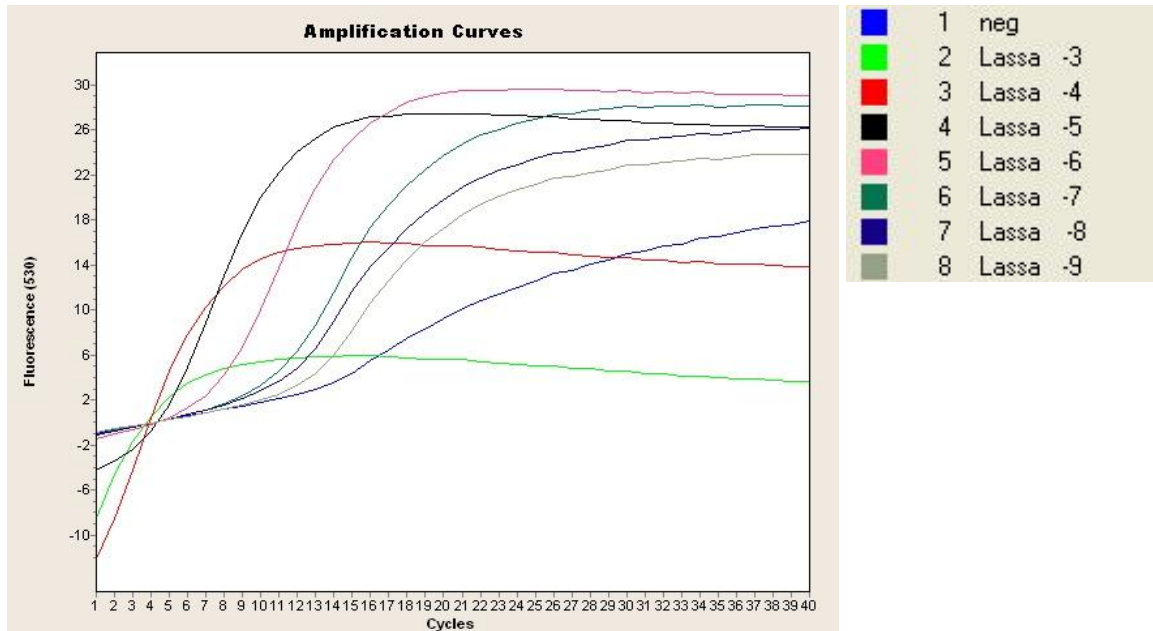
Das Ziel dieser Arbeit war es, die Schritte für die real-time PCR zu vereinfachen, ohne dass die Qualität des Nachweises darunter leidet. Die *in vitro* transkribierte RNS wurde mit dem gleichen Volumen und denselben Konzentrationen eingesetzt wie im konventionellen Cycler um einen direkten Vergleich zu ermöglichen.

Die Auswertung erfolgte direkt anschließend mit der LightCycler-Software anhand der Crossing-Point Berechnung und der Schmelzpunkte. Zusätzlich wurden 10 µl des RT-PCR-Ansatzes in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (Daten nicht gezeigt).



#### 5.4.1 Quantitative Lassa-Virus-RT-PCR auf dem LightCycler®

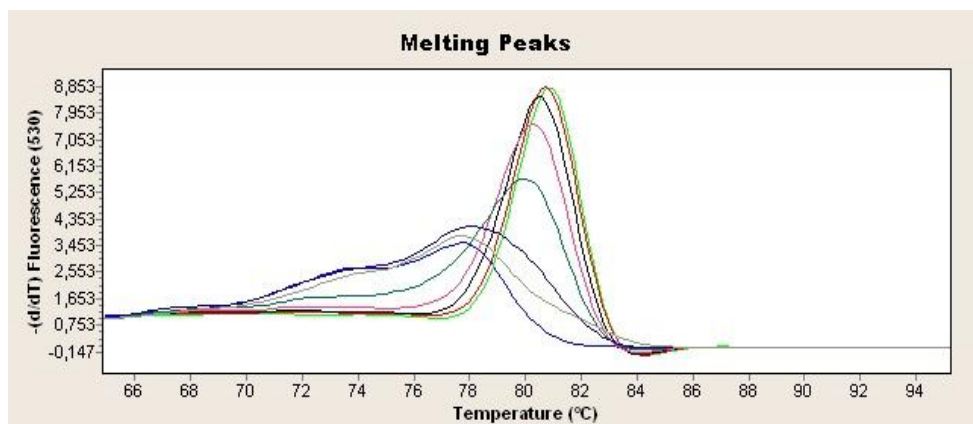
Die Realtime PCR mit den Lassa-Virus GP-spezifischen Oligonukleotiden ergab in Abb. 13 gezeigtes Ergebnis.



**Abb. 13 Nachweis Lassa-RNS mit dem LightCycler**

Die in vitro transkribierte Lassa-RNS wurde logarithmisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungen in die RT-PCR eingesetzt ( $10^{-3}$  –  $10^{-9}$ ). Als Negativkontrolle diente Wasser.

Bei der ersten Betrachtung der Graphen entsteht der Eindruck, dass ein Nachweis bis zur Verdünnung  $10^{-9}$  gelungen ist. Betrachtet man jedoch die Schmelzpunkte (Abb. 14), wird ersichtlich, dass es sich bei den beiden letzten Verdünnungsstufen ein unspezifischer Fluoreszenzanstieg gemessen wurde und die Nachweisgrenze bei  $10^{-7}$  liegt.

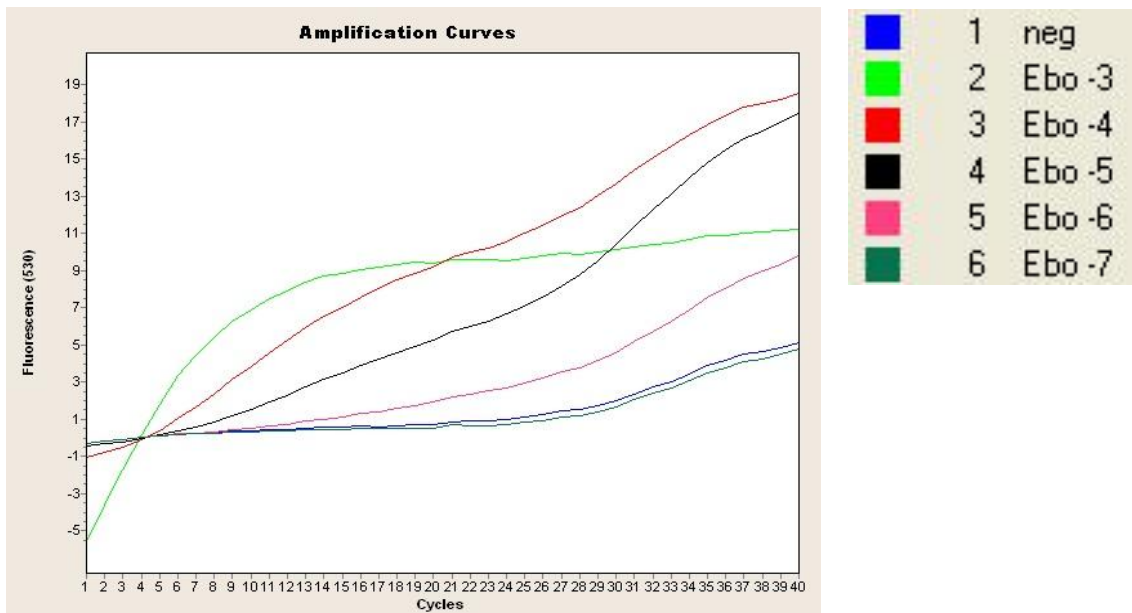


**Abb. 14 Schmelzkurve Lassa-GP mit dem LightCycler**

Der spezifische Schmelzpunkt des Amplifikats liegt bei ca. 80,5 °C ( $10^{-3}$  –  $10^{-7}$ ). Die Schmelzpunkte der Verdünnungsstufen  $10^{-8}$  &  $10^{-9}$  entsprechen ungefähr dem der Negativkontrolle.

#### 5.4.2 Quantitative Ebola-Virus-RT-PCR auf dem LightCycler®

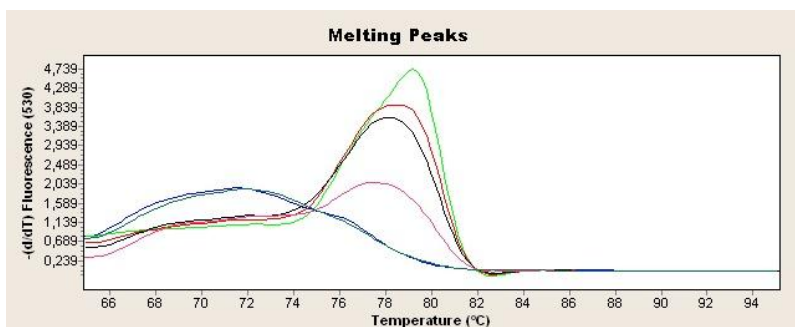
Die RT-PCR versus Ebola-Virus L-Protein RNS mit dem LightCycler ergab das in Abb. 15 gezeigte Fluoreszenzmuster:



**Abb. 15 Nachweis Ebola-RNS mit dem LightCycler**

Die in vitro transkribierte Lassa-RNS wurde logarithmisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungen in die RT-PCR eingesetzt. ( $10^{-3} - 10^{-7}$ ) Als Negativkontrolle diente Wasser.

Die Graphen zeigen einen untypischen Fluoreszenzverlauf. Lediglich in der Verdünnung  $10^{-3}$  erkennt man die übliche exponentielle Zunahme der Leuchtintensität mit anschließender Plateauphase. Die anderen Kurven sind nicht eindeutig zu beurteilen. Bei den Schmelzkurven (Abb. 16) erkennt man bis zur Verdünnung  $10^{-6}$  einen Gipfel bei ca. 78,7 °C, was der Schmelztemperatur des Amplifikats entspricht.



**Abb. 16 Schmelzkurve Ebola-L**

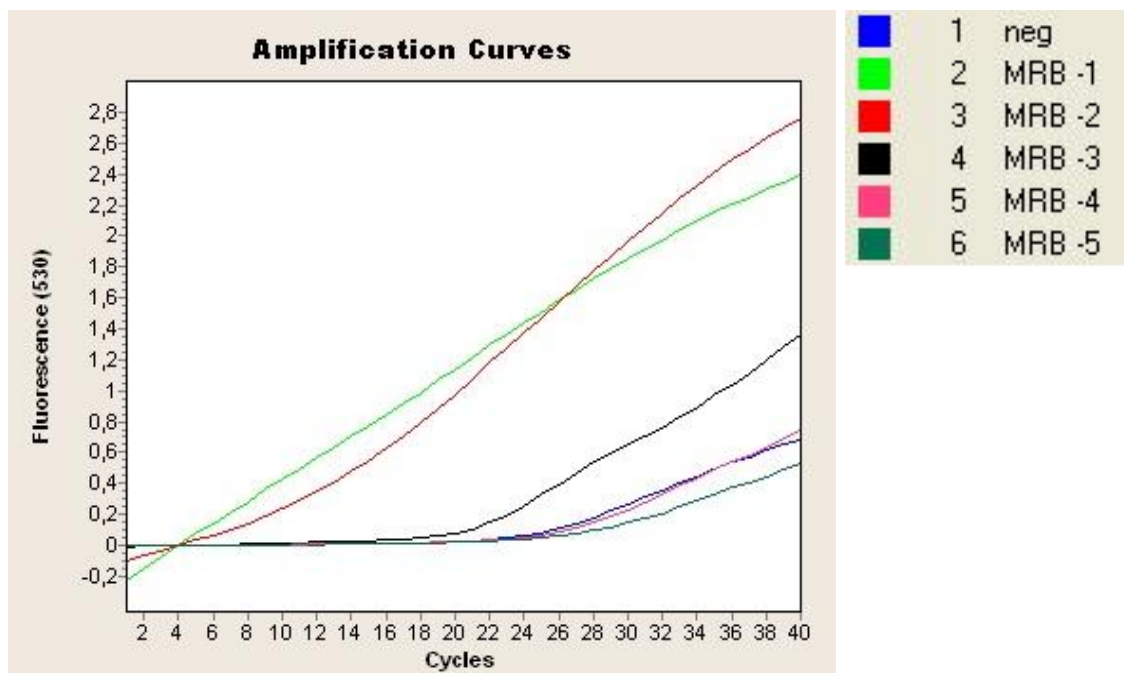
Der spezifische Schmelzpunkt des Amplifikats liegt bei ca. 78,7 °C ( $10^{-3} - 10^{-6}$ ). Der Schmelzpunkt der Verdünnungsstufe  $10^{-7}$  entspricht ungefähr dem der Negativkontrolle.

Nach Auftrennung im Agarosegel konnte dies durch den Nachweis einer 290 bp großen Bande bis zur Verdünnung  $10^{-6}$  bestätigt werden. (ohne Abbildung)

#### 5.4.3 Quantitative Marburg-Virus-RT-PCR auf dem LightCycler®

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Realtime PCR versus Ebola-Viren-RNS nicht so sensitiv wie die klassische RT-PCR ist, kam bei der Testung des Marburg-Virus-Nachweises ein SYBR-Green LightCycler RT-PCR Kit eines anderen Herstellers zum Einsatz (QuantiTect SYBR Green RT-PCR System, Qiagen), um auszuschliessen, dass die Erhöhung der Nachweisgrenze Reagenzien abhängig ist.

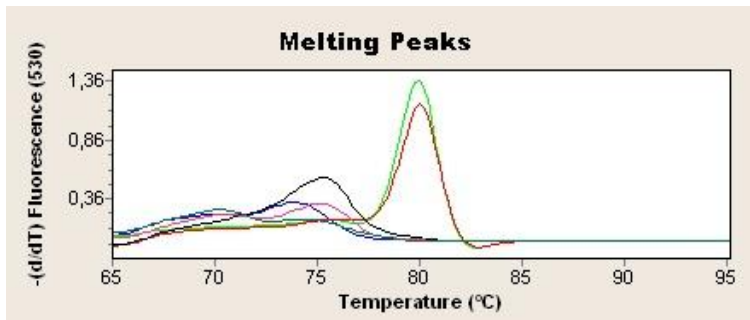
Nach Durchführung der RT-PCR gemäß 4.12.4 ergab sich der in Abb. 17 gezeigte Kurvenverlauf.



**Abb. 17 Nachweis Marburg-L RNS mit dem LightCycler**

Die in vitro transkribierte Marburg-RNS wurde logarithmisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungen in die RT-PCR eingesetzt. ( $10^{-3} - 10^{-7}$ ) Als Negativkontrolle diente Wasser.

In der Fluoreszenzmessung zeigt sich erneut ein unkonventionelles Bild. Von den anderen Graphen heben sich die Verdünnungsstufen  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  ab. Ihr annähernd linearer Fluoreszenzanstieg beginnt wesentlich früher und steigt im Verlauf auf eine wesentlich höhere Intensität. Das Fluoreszenzniveau bleibt dabei insgesamt jedoch auffällig niedrig. Die Schmelzpunktbestimmung (Abb. 18) zeigt für diese beiden höchsten eingesetzten Konzentrationsstufen einen Gipfel bei ca. 80 °C.



**Abb. 18 Schmelzkurve Marburg-L**

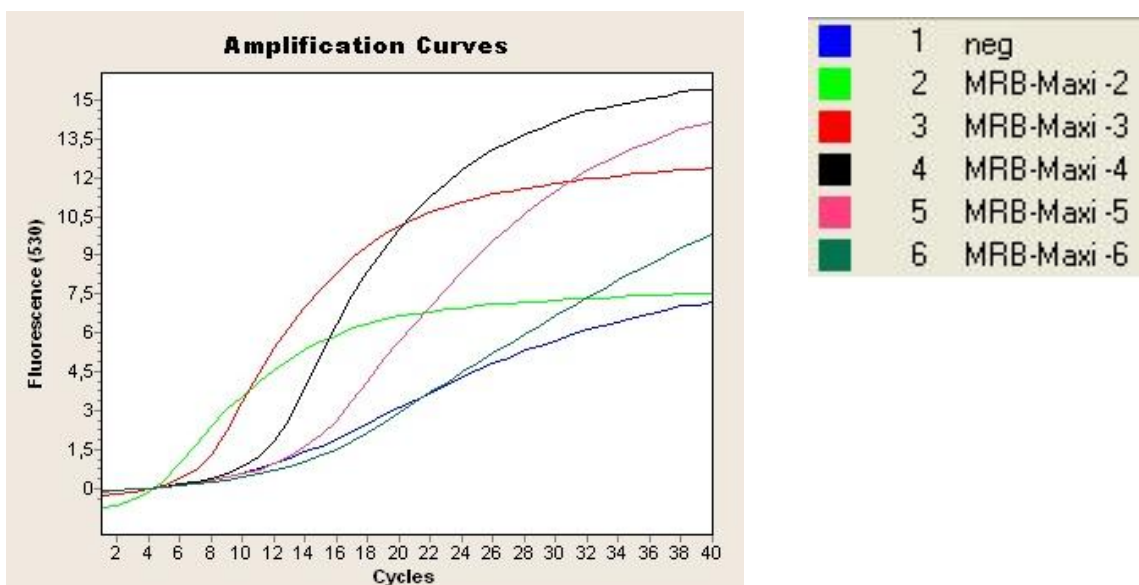
Der spezifische Schmelzpunkt des Amplifikats liegt bei ca. 80 °C ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ). Die Schmelzpunkte der Verdünnungstufen  $10^{-3}$  -  $10^{-5}$  entsprechen dem der Negativkontrolle.

Auch mit dem QuantiTect SYBR Green RT-PCR System der Firma Qiagen kann die Nachweisgrenze der Realtime Methode nicht verringert werden.

#### 5.4.4 Ansätze zur Optimierung der Filovirusdiagnostik auf dem LightCycler®

An erster Stelle wurde versucht, mit unterschiedlichen Zeit- und Temperatureinstellungen des Annealingschrittes der PCR-Zyklen die Sensitivität der Methode zu verbessern. Keine der veränderten Einstellungen erbrachte einen nennenswerten Sensitivitätsgewinn. Danach wurde Plasmid-DNS als Matrize verwendet, um abgrenzen zu können, ob eine insuffiziente RT-Reaktion der Grund für die schlechte Performance der RT-PCR ist.

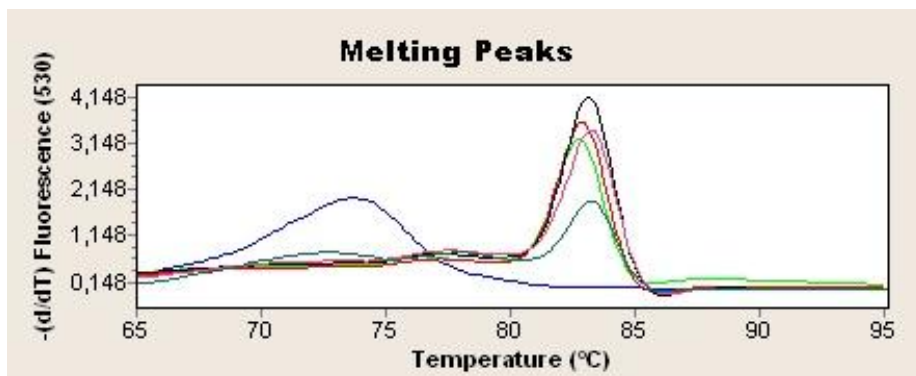
Unter Verwendung der unter 4.12.3.1 beschriebenen Einstellungen ergab sich das in Abb. 19 gezeigte Bild.



**Abb. 19 Nachweis Marburg-L DNS mit dem LightCycler**

Die Plasmid-DNS wurde logarithmisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungstufen ( $10^{-2}$  –  $10^{-6}$ ) in der PCR eingesetzt. Als Negativkontrolle diente Wasser.

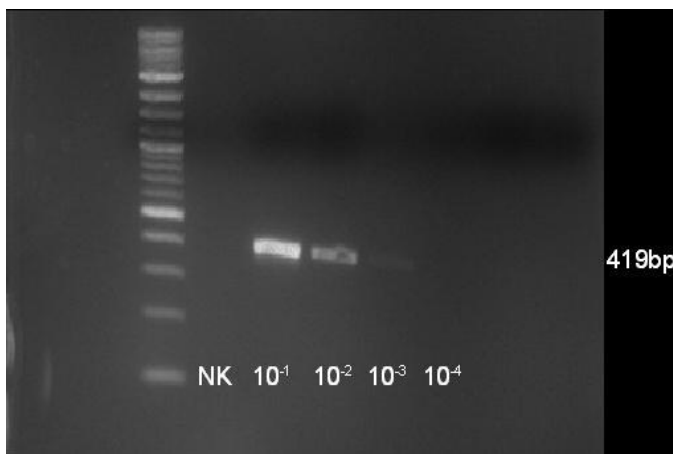
Die Graphen entwickeln sich wesentlich geordneter, ähnlich wie in Abb. 15, die die Versuchsreihe mit Ebola-RNS darstellt. Unter Verwendung von Marburg-Virus spezifischer DNS konnte eine wesentliche Steigerung der Fluoreszenzsignale erreicht werden. Dennoch ist der Kurvenverlauf noch als suboptimal zu bezeichnen. Lediglich die Graphen der Verdünnungsstufen  $10^{-2}$  –  $10^{-5}$  weisen einen halbwegs exponentiellen Anstieg mit anschließender Plateauphase auf. (Siehe auch zum Vergleich Abb. 13) Die Schmelzpunkte (Abb. 20) weisen auf ein spezifisches Amplifikat bis in der Verdünnungstufe  $10^{-6}$  hin. Der spezifische Schmelzpunkt der Amplifikate liegt bei 83 °C.



**Abb. 20 Schmelzkurve Marburg-L**  
Der spezifische Schmelzpunkt des Amplifikats liegt bei ca. 83 °C.

#### 5.4.5 Vergleich der Oligonukleotidpaare FiloA / B und Filohin / rück

Das neu entwickelte Oligonukleotidpaar zur Detektion der Filoviren Filohin / -rück musste nach der Überprüfung *in silico* auch noch den Praxistest bestehen und wurde dafür mit dem etablierten Oligonukleotidpaar FiloA / B verglichen. Als Template wurde RNS aus Zellkulturüberständen zweier Ebola-Zaire Stämme (Eckron und Gabon) aus dem Sicherheitslabor verwendet. Mit beiden Oligonukleotidpaaren ließ sich die RNS des Gabon Subtyps nicht nachweisen (Ergebnisse nicht gezeigt). Auch nach nochmaligem RNS-Extraktionsversuch eines weiteren Zellkulturansatzes konnte kein Amplifikat erzielt werden, so dass von einer Degeneration der RNS vor der Extraktion ausgegangen wurde. Der Subtyp Eckron wurde von beiden Oligonukleotidpaaren bis zur Verdünnung  $10^{-3}$  erkannt. Die Performance des FiloA / B war dabei besser (Abb. 21). Bei Filohin / -rück konnte erst nach digitaler Bildbearbeitung die Bande von der Verdünnungsstufe  $10^{-3}$  schwach sichtbar gemacht werden (Abb. 22).

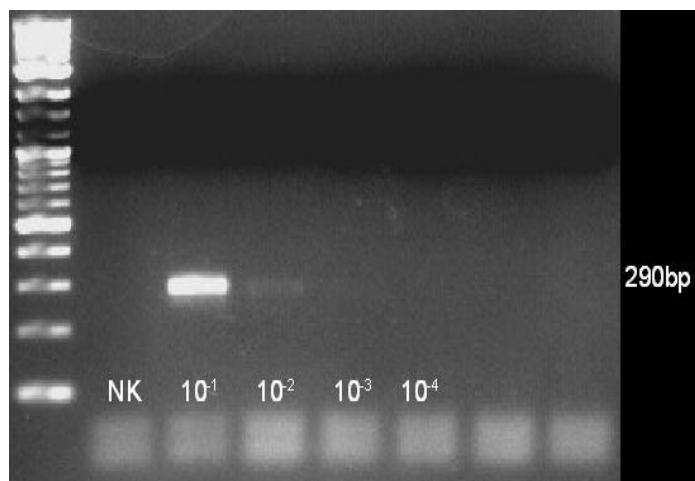


**Abb. 21 Nachweis Ebola-Zaire (Eckron) mit FiloA / B mittels RT-PCR**

Die Ebola-RNS wurde logarithmisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungen in die RT-PCR eingesetzt ( $10^{-1} - 10^{-6}$ ). Zu erwartende Größe des Amplifikats: 419 bp. Als Negativkontrolle diente Wasser (NK). Zur Abschätzung der Größe der amplifizierten DNS wurde der „2-Log Marker“ mit aufgetrennt. Aufgetragen wurden 10 µl des RT-PCR Ansatzes.

**Abb. 22 Nachweis Ebola-Zaire (Eckron) mit Filohin / rück mittels RT-PCR**

Die Ebola-RNS wurde logarithmisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungen in die RT-PCR eingesetzt ( $10^{-1} - 10^{-6}$ ). Zu erwartende Größe des Amplifikats: 290 bp. Als Negativkontrolle diente Wasser (NK). Zur Abschätzung der Größe der amplifizierten DNS wurde der „2-Log Marker“ mit aufgetrennt. Aufgetragen wurden 10 µl des RT-PCR Ansatzes.

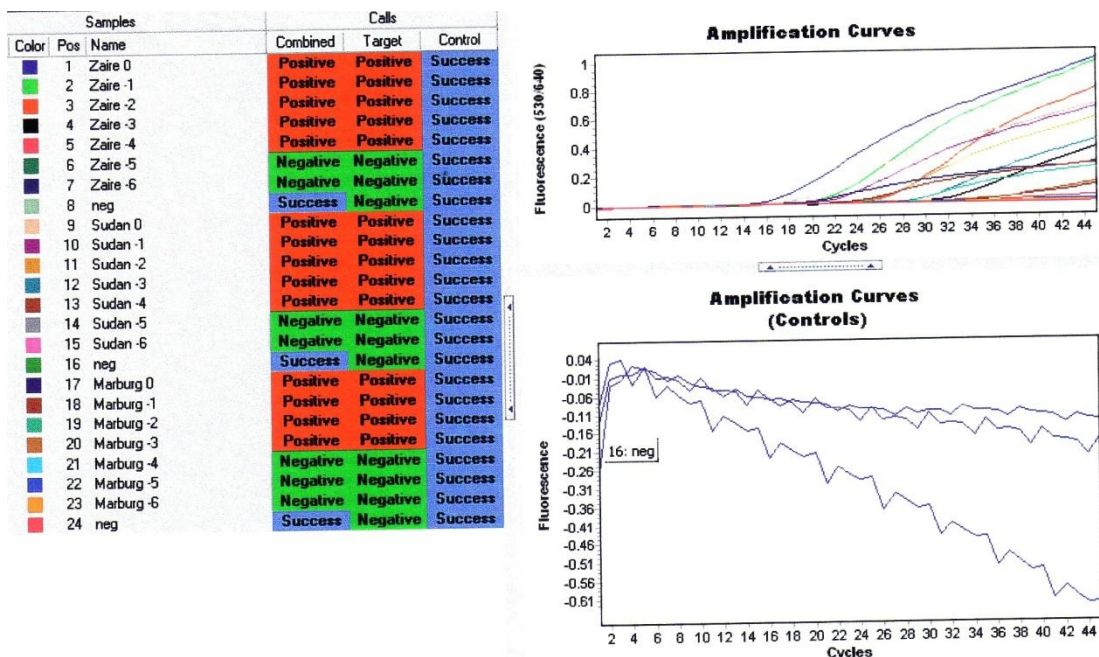




#### 5.4.6 Vergleich mit weiteren Protokollen

Bei einem Ringversuch im Rahmen des „VHF/Variola - Project“ ergab sich die Möglichkeit des Vergleiches der dort verwendeten Protokolle mit den in dieser Arbeit entwickelten. Bei Ringversuchen werden standardisierte Proben national oder auch international an Labore verschickt und dort getestet. Sie sind ein Instrument der externen Qualitätssicherung bzw. ermöglichen durch die identischen Proben den direkten Vergleich unterschiedlicher Arbeits- und Messmethoden. Beim VHF/Variola – Project lag der Schwerpunkt auf Viren, die sich für bioterroristische Zwecke eignen.

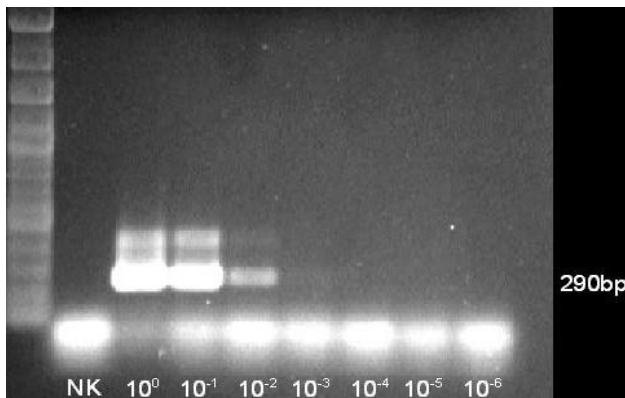
Für Filoviren wurde eine RT-PCR mit spezifischen Sonden für die Subtypen durchgeführt (Panning et al., 2007). Die nachfolgende Grafik (Abb. 23) des Lightcyclers ergibt folgende Nachweisgrenzen: Ebola-Zaire und Ebola-Sudan Nachweis bis Verdünnungsstufe  $10^{-4}$ . Marburg-Virus bis Verdünnungsstufe  $10^{-3}$



**Abb. 23 Nachweis von Ebola-Zaire, Ebola-Sudan und Marburg-Virus**

Die bereitgestellten RNS Proben wurden logarithmisch verdünnt und die jeweiligen Verdünnungsstufen ( $10^0 - 10^{-6}$ ) in der Real Time RT-PCR eingesetzt. Pos. 1-16: Ebola-RNS (Zaire/Sudan), Pos. 17-24: Marburg-Virus-RNS. Als Negativkontrolle diente Wasser (neg).

Mit denselben RNS-Verdünnungsreihen wurde der Gegenversuch durchgeführt. Auf die Zugabe der Competimer und 18S-RNS wurde diesmal verzichtet. Die folgenden Ergebnisse zeigen, dass die Nachweisgrenzen jeweils eine Log-Stufe geringer waren (Abb. 24, Abb. 25, Abb. 26). Die Bande der jeweils höchsten nachweisbaren Verdünnungsstufe ist nur schwach zu erkennen.

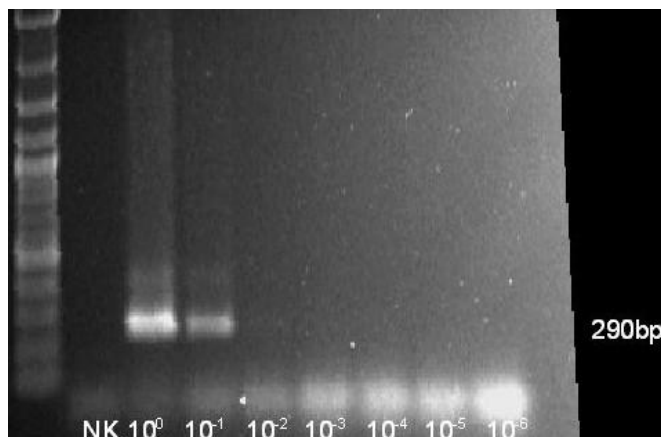
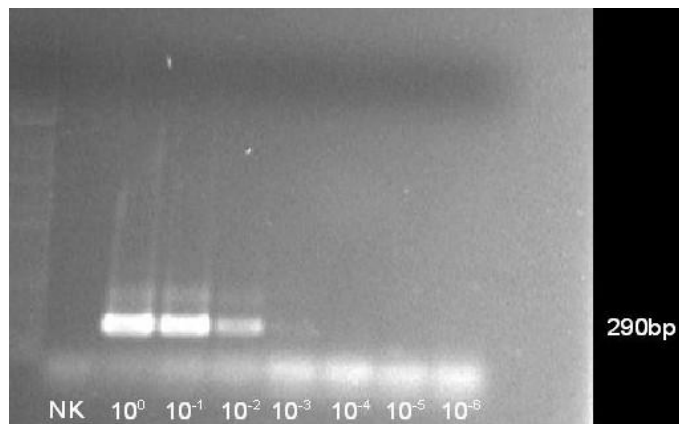


**Abb. 24 Nachweis Ebola-Zaire-Virus-RNS mit Filohin / -rück mittels RT-PCR**

Die in vitro transkribierte Ebola-RNS wurde logarithmisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungen in die RT-PCR eingesetzt ( $10^0 - 10^{-6}$ ). Erwartete Größe des Amplifikats: 290 bp. Als Negativkontrolle diente Wasser (NK). Zur Abschätzung der Größe der amplifizierten DNS wurde der „2-Log Marker“ mit aufgetrennt. Aufgetragen wurden 10 µl des RT-PCR Ansatzes.

**Abb. 25 Nachweis Ebola-Sudan-Virus-RNS mit Filohin / -rück mittels RT-PCR**

Die in vitro transkribierte Ebola-RNS wurde logarithmisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungen in die RT-PCR eingesetzt ( $10^0 - 10^{-6}$ ). Erwartete Größe des Amplifikats: 290 bp. Als Negativkontrolle diente Wasser (NK). Zur Abschätzung der Größe der amplifizierten DNS wurde der „2-Log Marker“ mit aufgetrennt. Aufgetragen wurden 10 µl des RT-PCR Ansatzes.



**Abb. 26 Nachweis Marburg-Virus-RNS mit Filohin / -rück mittels RT-PCR**

Die in vitro transkribierte Marburg-RNS wurde logarithmisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungen in die RT-PCR eingesetzt ( $10^0 - 10^{-6}$ ). Erwartete Größe des Amplifikats: 290 bp. Als Negativkontrolle diente Wasser (NK). Zur Abschätzung der Größe der amplifizierten DNS wurde der „2-Log Marker“ mit aufgetrennt. Aufgetragen wurden 10 µl des RT-PCR Ansatzes.

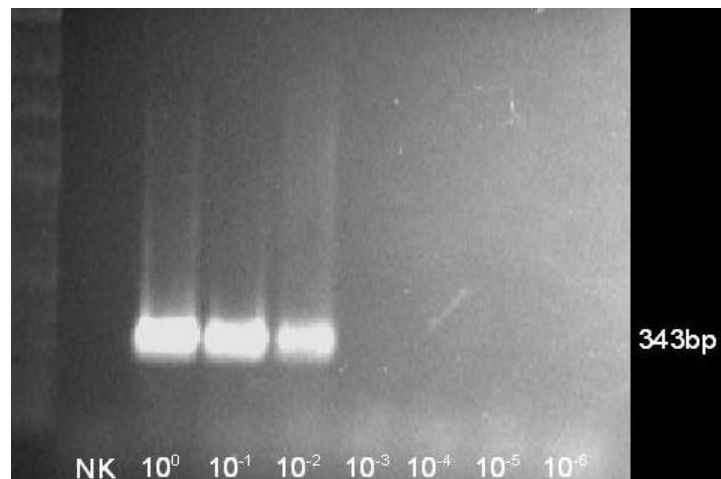


Im Ringversuch kam bezüglich der Arenaviren eine Auswahl verschiedener RT-PCR-Protokolle mit Sonden oder anschließender Gel-Detektion zum Einsatz. Hierbei wurde nicht nur zwischen den „Old-World-Arenaviruses“ und den süd-amerikanischen Subtypen unterschieden, sondern sie hatten auch unterschiedliche Genabschnitte als Ziel (Vieth et al., 2007). Für einen direkten Vergleich eignete sich nur das konventionelle Protokoll, welches ebenfalls das GPC-Gen auf dem Lassa-S-Fragment erkennt. Eingesetzt wurde die logarithmische Verdünnungsreihe eines *in vitro* transkribierten GPC-Gen Fragmentes.

Bei beiden Protokollen gelang ein Nachweis bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-2}$ . Exemplarisch wird an dieser Stelle nur das Gelbild (Abb. 27) des in dieser Arbeit entwickelten Protokolls aufgeführt.

**Abb. 27 Nachweis Lassa-GPC RNS**

Die *in vitro* transkribierte Lassa-RNS wurde logarithmisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungen in die RT-PCR eingesetzt. ( $10^0 - 10^{-6}$ ) Erwartete Größe des Amplifikats: 343 bp. Als Negativkontrolle diente Wasser (NK). Zur Abschätzung der Größe der amplifizierten DNS wurde der „2-Log Marker“ mit aufgetrennt. Aufgetragen wurden 10 µl des RT-PCR Ansatzes.



## 6 Diskussion

Für die Diagnostik von viralen Infektionen existieren in der modernen Medizin zahlreiche Nachweisverfahren, die sich zunächst grundsätzlich in direkte oder indirekte Detektion einteilen lassen. Bei der indirekten Methode werden nicht die Viren selbst, sondern die Immunantwort des befallenen Organismus in Form von Antikörpern nachgewiesen. Die direkten Verfahren versuchen das Virus selbst bzw. dessen Bestandteile zu erkennen. Hierzu gehören z.B. die Elektronenmikroskopie, die Virusanzucht sowie molekularbiologische Methoden wie Antigen- oder Nukleinsäurenachweise. Jede dieser Methoden birgt in sich Vor- und Nachteile. Der Nachweis von Antikörpern ist in der Regel kostengünstig. Voraussetzung ist jedoch selbstverständlich, dass Antikörper gebildet werden, was nicht selten erst nach Tagen oder sogar Wochen der Fall ist. Bei CCHFV-Infektionen mit fatalem Ausgang z.B. bleibt eine Antikörperantwort sogar meist ganz aus (Schmaljohn, Nichol, 2007). Die Virusanzucht muss in Hochsicherheitslaboratorien der Stufe L 4 erfolgen, die nicht überall verfügbar sind. Hinzu kommt das Risiko von Laborinfektionen. Ein Antigen-Nachweis mittels ELISA wurde für die meisten HF-Viren etabliert (Saijo, 2006, Saijo, 2007, Towner, 2004, Bausch, 2000), setzt aber eine ausreichende Konzentration des nachzuweisenden Antigens voraus, was unter Umständen mehrere Tage dauern kann. Eine große Auswahl von Protokollen für den Nukleinsäurenachweis mittels RT-PCR wurden mittlerweile erstellt und veröffentlicht (z.B. Drosten, 2002; Drosten, 2003; Leroy, 2000; Towner, 2004; Gibb, 2001; Gibb, 2001; Vieth, 2007; Weidmann, 2004). Diese Protokolle werden zudem ständig weiterentwickelt und durch die Weiterentwicklung der PCR-Geräte ist sogar prinzipiell eine Quantifizierung der Viruslast möglich geworden (Drosten et al., 2002, Panning et al., 2007).

Ziel dieser Arbeit war ein einheitliches Verfahren zum Nachweis viraler RNS der wichtigsten von Mensch zu Mensch übertragbaren, hämorrhagisches-Fieber auslösenden Viren zu etablieren. Bei einem Verdachtsfall können so in einem einzigen Lauf die differentialdiagnostisch schwierig zu unterscheidenden Erreger identifiziert werden, was eine Ersparnis von Arbeits- und Zeitaufwand mit sich bringt. Darüber hinaus sollte die Integration einer internen Kontrolle in

Form einer Multiplex RT-PCR die Richtigkeit des Ergebnisses validieren und kann darüber hinaus bei der Aufdeckung von Inhibitoren oder Verfahrensfehlern dienlich sein. Als mögliche Inhibitoren der (RT-)PCR Reaktion wurden Hämoglobin (Akane et al., 1994), Polysaccharide (Monteiro et al., 1997), EDTA und Proteinase K (Seesod et al., 1993), Virostatika wie Aciclovir (Yedidag et al., 1996) oder Malaria-Therapeutika (Arai et al., 1994) und Heparin (Holodniy et al., 1991) beschrieben.

Ferner wurde angestrebt die Viruslast quantifizieren zu können, denn die quantitative Diagnostik birgt einige Vorteile. Die Viruslast beziffern zu können ist nicht nur von akademischem Interesse, sondern offenbart durch Mehrfachmessungen des viralen Titters, ob die eingeschlagene Therapie erfolgreich ist oder sich die Situation des Patienten weiter verschlechtern wird. Nosokomiale Infektionen sind dann am Wahrscheinlichsten, wenn besonders hohe Viruskonzentrationen vorliegen. Insofern könnte das Wissen um die Viruslast Aussagen über die akute Infektionsgefahr zulassen und dazu führen, dass die Sicherheitsmaßnahmen bei der Betreuung entsprechend angeglichen werden können.

Das wichtigste Kriterium war jedoch, dass die RT-PCR eine hohe Sensitivität aufweist und auch Proben, die nur geringe Mengen viraler RNS enthalten noch als positiv erkennt. Von Bedeutung ist dies besonders bei Kontaktpersonen Erkrankter, die bisher keine oder nur milde Symptome aufweisen und bei Rekonvaleszenten, um das Ende der Kontagiösität zu ermitteln. Auch bei Patienten, die das Vollbild der Erkrankung aufweisen und entsprechend mit einer hohen Viruslast zu rechnen ist, kann eine falsche Handhabung oder Lagerung der Proben dazu führen, dass die Konzentration der nicht besonders umweltresistenten Viren empfindlich abnimmt. Die unter Umständen langen Transportwege in die Referenzlabore tragen zusätzlich zu dieser Problematik bei. Auch PCR-Inhibitoren (s.o.) können zu einem falsch-negativen Ergebnis führen, was im Fall von übertragbaren VHF fatale Folgen nach sich ziehen kann. Ein Ausbleiben des Nachweises der ribosomalen 18S-RNS liefert einen Anhalt für das Vorhandensein solcher Inhibitoren und kann Anstoß geben, die Fehlerquelle auszuschalten.

In dieser Arbeit wurde eine Multiplex RT-PCR etabliert, die alle diese Bedingungen erfüllt. Bei allen behandelten viralen Genomen gelang ein Nachweis bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-9}$ . Die interne Kontrolle sichert die Richtigkeit des Ergebnisses ohne dabei die Sensitivität negativ zu beeinflussen. In einigen RT-PCR Läufen konnte sogar eine Verbesserung der Performance beobachtet werden. Dies ist vermutlich auf einen protektiven Effekt der zugefügten 18S-RNS zurückzuführen, die kompetitiv die virale RNS vor RNasen schützt. Die Multiplex-RT-PCR ermöglicht zusätzlich eine semi-quantitative Beurteilung der Viruslast. Bei sehr hohen Viruskonzentrationen waren die Amplifikate der 18S-RNS im Agarosegel nicht erkennbar (Daten nicht gezeigt). Mit Abnahme der viralen Genomkopien nahm die Dicke der Kontrollbande proportional bis zum Erreichen eines Maximums zu (siehe z.B. Abb. 9). Währenddessen verringerte sich die Intensität der dem viralen Genom zugeordneten Bande entsprechend der Verdünnungsstufe. Ein Vergleich der beiden Amplifikate hinsichtlich der Leuchtintensität bietet demnach die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen sehr hoher, hoher, mittlerer und niedriger Viruslast. Um die interne Kontrolle nutzen zu können bedarf es im Gegensatz zu dem üblicherweise für PCRs eingesetzten zellfreien Serum einer Vollblutprobe, damit die ribosomale RNS extrahiert werden kann. Eine nachträgliche Zugabe von 18S-RNS oder Zellkultur-Zellen vor der Extraktion der viralen RNS ist prinzipiell möglich, ermöglicht dann aber nur die Kontrolle des RT- und PCR-Schrittes; die Integrität der Patientenprobe kann jedoch nicht mehr beurteilt werden.

Ein weiterer funktioneller Vorteil der in dieser Arbeit entwickelten Multiplex RT-PCR ist, dass der Mastermix soweit vorpipettiert und auf die Reaktionsgefäße verteilt werden kann, dass später nur noch die Polymerase und die Patientenprobe hinzu gegeben werden muss. Die Lagerung der Ansätze erfolgt idealerweise bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , so bleiben sie mindestens ein Jahr einsatzbereit.

Ein Vergleich der in dieser Arbeit entwickelten Oligonukleotide Filohin/ -rück mit den bisher für die Diagnostik von Filoviren verwendeten Oligonukleotiden FiloA / B zeigte in einem konventionellen RT-PCR Protokoll, dass grundsätzlich die gleiche Sensitivität erreicht wurde. Jedoch war die Performance der PCR, gemessen an der Leuchtintensität der amplifizierten Banden im Gel, bei den zu-

letzt genannten Oligonukleotiden besser. Dies könnte aber möglicherweise am eingesetzten Subtyp, dem Ebola-Zaire Stamm Eckron liegen. RNS von weiteren Stämmen, um diese Hypothese zu prüfen waren leider nicht verfügbar.

Bei dem Vergleich mit den Protokollen des *VHF/Variola Projects* zeigte sich, dass die Real-Time Protokolle für Filoviren mit Sonden eine Log-Stufe sensitiver waren als das in dieser Arbeit entwickelte. Dies liegt womöglich darin begründet, dass die Sonden aufgrund ihrer Spezifität für die jeweiligen Genabschnitte bessere Ergebnisse erzielen konnten als die Filohin / -rück Oligonukleotide, die für die Erkennung aller zum Zeitpunkt der praktischen Durchführung bekannten Filoviren gleichermaßen ausgelegt sind (außer Ebola-Bundibugyo). Zusätzlich haben Sonden den Vorteil, dass sie eine intrinsische Leuchtaktivität haben, sobald sie an komplementäre DNS binden. Bei der Detektion im Agarosegel mit Ethidiumbromid können zu kurzes oder zu langes Anfärben bzw. zu niedrige oder zu hohe Ethidiumbromidkonzentrationen Einfluss auf das Nachweisergebnis haben.

Durch die hohe Spezifität der Sonden können diese wiederum nur die entsprechenden Subtypen erkennen. Bei einem Verdachtsfall von Filovirus-Infektion müssten so zwangsläufig mindestens drei RT-PCR Ansätze getestet werden, was sich in den resultierenden Kosten und dem Arbeitsaufwand niederschlägt. Für den differentialdiagnostischen Nachweis anderer VHF müssten weitere RT-PCR Läufe durchgeführt werden, da sich deren Protokolle unterscheiden und nicht, wie bei den in dieser Arbeit etablierten, auf einem Gerät mit den selben Zeiteinstellungen durchgeführt werden können.

Die RT-PCR auf dem LightCycler ist prinzipiell schneller und lässt eine genauere quantitative Beurteilung der Proben zu. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigten jedoch ein unerklärliches Sensitivitätsdefizit und eine unzureichende Performance bei den Filoviren. Der RT-Schritt konnte nicht als alleinige Ursache gelten, um die schlechte Qualität der PCR zu erklären. Selbst mit einem auf DNS ausgerichteten Kit zeigten sich relativ unförmige Graphen. Es drängte sich der Verdacht auf, dass die Oligonukleotide sich nicht optimal für die real-time Diagnostik mit dem LightCycler eignen. Um dies zu testen muss-

te aus Zellkulturüberständen extrahierte virale RNS verwendet werden, da die zum Vergleich benutzten Oligonukleotide FiloA und FiloB nicht mit der *in vitro* transkribierten RNS benutzt werden können. Mit beiden Oligonukleotidpaaren misslang ein Nachweis der viralen RNS durch eine RT-PCR mit dem Lightcycler. Zusammen mit dem beobachteten deutlichen Sensitivitätsverlust bei der Lassa-Virus RT-PCR mit dem LightCycler im Vergleich zu der mit dem GeneAmp2700 führten die Ergebnisse bei den Filoviren zum Abbruch der Bemühungen den LightCycler einzusetzen. Zudem bietet sich auf dem LightCycler unter Verwendung von *Sybr Green* Protokollen nicht die Möglichkeit der Integration einer internen Kontrolle in Form einer Multiplex RT-PCR. Ein weiteres Manko sind die empfindlichen Kapillaren, die gelegentlich bei der obligatorischen Zentrifugation des RT-PCR Ansatzes in die Spitze zerbrechen und eine Wiederholung des Arbeitsschrittes notwendig machen. Ebenfalls zu berücksichtigen sind die hohen Kosten, die die Anschaffung und die Verbrauchsmaterialien des LightCyclers verursachen. Gerade in den Ländern, in denen die VHF endemisch sind, sind Kosten ein entscheidendes Kriterium.

## **7 Zusammenfassung**

In dieser Arbeit wurde eine konventionelle RT-PCR für die wichtigsten nosokomial übertragbaren Hämorrhagische Fieber auslösenden Viren (Marburg-, Ebola-, Lassa-, Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber Virus) etabliert und mit einer real-time RT-PCR auf dem Roche LightCycler verglichen. Dabei zeigte sich, dass die konventionelle RT-PCR der real-time RT-PCR in Punkto Sensitivität und Performance deutlich überlegen ist. Es konnte gezeigt werden, dass die konventionelle RT-PCR ein hoch-sensitives Verfahren ist, bei dem sich zudem die Richtigkeit des Ergebnisses durch die Integrierung einer internen Kontrolle ohne Sensitivitätsverlust verifizieren lässt. Außerdem wurden die RT-PCR Protokolle so ausgelegt, dass sie gleichzeitig in einem PCR-Cycler laufen können. Des Weiteren wurde getestet, ob die Reaktionsansätze für die Multiplex RT-PCR zur Komplettierung vorpipettiert für ihren Einsatz bereit gehalten werden können. Die Funktionalität konnte für mindestens ein Jahr sichergestellt werden.

## Literaturverzeichnis

- Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K.** Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J Forensic Sci.* 1994 Mar;39(2):362-72.
- Arai M, Mizukoshi C, Kubochi F, Kakutani T, Wataya Y.** Detection of *Plasmodium falciparum* in human blood by a nested polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Nov;51(5):617-26.
- Barrette RW, Metwally SA, Rowland JM, Xu L, Zaki SR, Nichol ST, Rollin PE, Towner JS, Shieh WJ, Batten B, Sealy TK, Carrillo C, Moran KE, Bracht AJ, Mayr GA, Sirios-Cruz M, Catbagan DP, Lautner EA, Ksiazek TG, White WR, McIntosh MT.** Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus. *Science.* 2009 Jul 10;325(5937):204-6.
- Basler CF, Mikulasova A, Martinez-Sobrido L, Paragas J, Mühlberger E, Bray M, Klenk HD, Palese P, Garcia-Sastre A.** The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *Journal of Virology* 2003; 77:7945-56
- Bausch DG, Rollin PE, Demby AH, et al.** Diagnosis and clinical virology of Lassa fever as evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent-antibody test, and virus isolation. *J Clin Microbiol* 2000 Jul;38(7):2670-7
- Berezin, V.V., Chumakov, M.P., Reshetnikov, I.A., Zgurskaya, G.N.** Study of the role of birds in the ecology of Crimean hemorrhagic fever virus. *Mater. 6 Simp. Izuch. Virus Ekol. Svyazan. Ptits.* (Omsk, 1971), 94–95 (Russisch).
- Borio L.** Hemorrhagic Fever Viruses as Biological Weapons. *American Medical Association* 2002
- Bray M.** Filoviridae. *Clinical Virology, Second Edition* 2002; 875-90; ISBN: 1-55581-226-0
- Bray M, Driscoll J, Huggins JW.** Treatment of lethal Ebola virus infection in mice with a single dose of an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor. *Antiviral Research* 2000; 45:135-47
- Burt FJ, Leman PA, Smith JF, Swanepoel R.** The use of a reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of viral nucleic acid in the diagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *J Virol Methods.* 1998 Feb;70(2):129-37.
- Burt FJ, Swanepoel R, Shieh WJ, Smith JF, Leman PA, Greer PW, Coffield LM, Rollin PE, Ksiazek TG, Peters CJ, Zaki SR.** Immunohistochemical and in situ localization of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus in human



tissues and implications for CCHF pathogenesis. *Archives of pathology & laboratory medicine* 1997; 121:839-46

**Bwaka MA, Bonnet MJ, Calain P, Colebunders R, De Roo A, Guimard Y, Katwili KR, Kibadi K, Kipasa MA, Kuvula KJ, Mapanda BB, Massamba M, Mupapa KD, Muyembe-Tamfum JJ, Ndaberey E, Peters CJ, Rollin PE, Van den Enden E, Van den Enden E.** Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients. *J. Infect. Dis.* 1999 Feb;179 Suppl 1:S1-7.

**Casals J.** Antigenic similarity between the virus causing Crimean hemorrhagic fever and Congo virus. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1969 May;131(1):233-6

**Cheprunov AA, Chuev YP, P'yankov V, Efimova IV.** Effects of some physical and chemical factors on inactivation of Ebola virus [in Russian]. *Voprosy Virusologii* 1995;40:40-3.

**Chen JP, Cosgriff TM.** Hemorrhagic fever virus-induced changes in hemostasis and vascular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000;11: 461-83

**Chumakov MP, Butenko AM, Shalunova NV, Mart'ianova LI, Smirnova SE, Bashkirtsev IuN, Zavodova TI, Rubin SG, Tkachenko EA, Karmysheva Vla, Reingol'd VN, Popov GV, Savinov AP.** New data on the viral agent of Crimean hemorrhagic fever. *Vopr Virusol.* 1968 May-Jun;13(3):377. (Russisch).

**CIDRAP.umn.edu.** Viral Hemorrhagic Fever (VHF): Current, comprehensive information on pathogenesis, microbiology, epidemiology, diagnosis, treatment, and prophylaxis.  
<http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/bt/vhf/biofacts/vhffactsheet.html> Last updated March 25, 2009

**Cummins D, McCormick JB, Bennett D, Samba JA, Farrar B, Machin SJ, Fisher-Hoch SP.** Acute sensorineural deafness in Lassa fever. *JAMA.* 1990 Oct 24-31;264(16):2093-6.

**Davies FG, Mwakima F.** Qualitative studies of the transmission of Nairobi sheep disease virus by *Rhipicephalus appendiculatus*. *J.* 1982, *Comp. Path.*, 92:15.

**Demby AH, Chamberlain J, Brown DW, Clegg CS.** Early diagnosis of Lassa fever by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 1994 Dec; 32(12):2898-903

**Dominguez-Soto A, Aragonese-Fenoll L, Martin-Gayo E, Martinez-Prats L, Colmenares M, Naranjo-Gomez M, Borrás FE, Munoz P, Zubiaur M, Toribio ML, Delgado R, Corbi AL.** The DC-SIGN-related lectin LSECtin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells. *Blood.* 2007 Jun 15;109(12):5337-45. Epub 2007 Mar 5.

- Downs WG, Anderson CR, Spence L, Aitken T, Greenhal AH.** Tacaribe Virus, a New Agent Isolated from Artibeus Bats and Mosquitoes in Trinidad, West Indies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 12(4), 1963, pp. 640-646
- Drosten C, Gottig S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, Gunther S.** Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *Journal of clinical microbiology* 2002; 40(7):2323-30
- Drosten C, Kummerer BM, Schmitz H, et al.** Molecular diagnostics of viral hemorrhagic fevers. *Antiviral Res* 2003 Jan;57(1-2):61-87
- Elliott LH, McCormick JB, Johnson KM.** Inactivation of Lassa, Marburg, and Ebola viruses by gamma irradiation. *J Clin Microbiol.* 1982 October; 16(4): 704–708.
- Ellis DS, Southee T, Lloyd G, Platt GS, Jones N, Stamford S, Bowen ET, Simpson DI.** Congo/Crimean haemorrhagic fever virus from Iraq 1979: I. Morphology in BHK21 cells. *Arch Virol.* 1981;70(3):189-98.
- Ergönül O, Celikbaş A, Dokuzoguz B, Eren S, Baykam N, Esener H.** Characteristics of patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever in a recent outbreak in Turkey and impact of oral ribavirin therapy. *Clin Infect Dis.* 2004 Jul 15;39(2):284-7. Epub 2004 Jul 2.
- Feldmann H, Mühlberger E, Randolph A, Will C, Kiley MP, Sanchez A, Klenk HD.** Marburg virus, a filovirus: messenger RNAs, gene order, and regulatory elements of the replication cycle. *Virus Res.* 1992 Jun;24(1):1-19.
- Fisher-Hoch SP, Platt GS, Neild GH, Southee T, Baskerville A, Raymond RT, Lloyd G, Simpson DI.** Pathophysiology of shock and hemorrhage in a fulminating viral infection (Ebola). *J. Infect. Dis.* 1985 Nov;152:887-94.
- Flick R, Whitehouse CA.** Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Current Molecular Medicine* 2005; 5:753-60
- Formenty P, Hatz C, Le Guenno B, Stoll A, Rogenmoser P, Widmer A.** Human infection due to Ebola virus, subtype Côte d'Ivoire: clinical and biologic presentation. *J Infect Dis.* 1999 Feb;179 Suppl 1:S48-53.
- Frame JD, Baldwin JM Jr, Gocke DJ, Troup JM.** Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. I. Clinical description and pathological findings. *Am J Trop Med Hyg.* 1970 Jul;19(4):670-6.
- Gear JS, Cassel GA, Gear AJ, Trappler B, Clausen L, Meyers AM, Kew MC, Bothwell TH, Sher R, Miller GB, Schneider J, Koornhof HJ, Gomperts ED, Isaäcson M, Gear JH.** Outbreak of Marburg virus disease in Johannesburg. *Br Med J.* 1975 Nov 29;4(5995):489-93.

**Geisbert TW, Hensley LE, Jahrling PB, Larsen T, Geisbert JB, Paragas J, Young HA, Fredeking TM, Rote WE, Vlasuk GP.** Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa/tissue factor: a study in rhesus monkeys. *Lancet* 2003; 362:1953-8

**Geisbert TW, Hensley LE, Larsen T, Young HA, Reed DS, Geisbert JB, Scott DP, Kagan E, Jahrling PB, Davis KJ.** Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection. *Am J Pathol.* 2003 Dec;163(6):2347-70.

**Gibb TR, Norwood DA Jr, Woollen N, et al.** Development and evaluation of a fluorogenic 5' nuclease assay to detect and differentiate between Ebola virus subtypes Zaire and Sudan. *J Clin Microbiol* 2001 Nov;39(11):4125-30

**Gibb TR, Norwood DA Jr, Woollen N, et al.** Development and evaluation of a fluorogenic 5'-nuclease assay to identify Marburg virus. *Mol Cell Probes* 2001 Oct;15(5):259-66

**Gonzalez JP, Nakoune E, Slenczka W, Vidal P, Morvan JM.** Ebola and Marburg virus antibody prevalence in selected populations of the Central African Republic. *Microbes and infection* 2000 2:39-44

**Grolla A, Lucht A, Dick D, Strong JE, Feldmann H.** Laboratory diagnosis of Ebola and Marburg hemorrhagic fever. *Bull Soc Pathol Exot.* 2005 Sep;98(3):205-9.

**Günther S, Weisner B, Roth A, Grewing T, Asper M, Drosten C, Emmerich P, Petersen J, Wilczek M, Schmitz H.** Lassa Fever Encephalopathy: Lassa Virus in Cerebrospinal Fluid but not in Serum. *J. Infect. Dis.* 2001; 184:345-9

**Haas WH, Breuer T, Pfaff G, Schmitz H, Köhler P, Asper M, Emmerich P, Drosten C, Gölnitz U, Fleischer K, Günther S.** Imported Lassa Fever in Germany: Surveillance and Management of Contact Persons. *Clin Infect Dis.* (2003) 36 (10): 1254-1258.

**Haferkamp S, Fernando L, Schwarz TF, Feldmann H, Flick R.** Intracellular localization of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) virus glycoproteins. *Virology Journal* 2005; 2:42

**Han Z, Boshra H, Sunyer JO, Zwiers SH, Paragas J, Harty RN.** Biochemical and functional characterization of the Ebola virus VP24 protein: implications for a role in virus assembly and budding. *Journal of Virology* 2003; 77:1793-800

**Harcourt BH, Sanchez A, Offermann MK.** Ebola virus selectively inhibits responses to interferons, but not to interleukin-1beta, in endothelial cells. *Journal of Virology* 1999; 73:3491-6

**Hartlieb B, Modrof J, Mühlberger E, Klenk HD, Becker S.** Oligomerization of Ebola virus VP30 is essential for viral transcription and can be inhibited by a synthetic peptide. *Journal of biological chemistry* 2003; 278:41830-6

**Hayes CG, Burans JP, Ksiazek TG, Del Rosario RA, Miranda ME, Manaloto CR, Barrientos AB, Robles CG, Dayrit MM, Peters CJ.** Outbreak of fatal illness among captive macaques in the Philippines caused by an Ebola-related filovirus. *Am J Trop Med Hyg.* 1992 Jun;46(6):664-71.

**Hoenen T, Volchkov V, Kolesnikova L, Mittler E, Timmins J, Ottmann M, Reynard O, Becker S, Weissenhorn W.** VP40 octamers are essential for Ebola virus replication. *Journal of Virology* 2005; 79:1898-905

**Holodniy M, Kim S, Katzenstein D, Konrad M, Groves E, Merigan TC.** Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. *J Clin Microbiol.* 1991 Apr;29(4):676-9.

**Hoogstraal, H.** The epidemiology of tick-borne Crimean–Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *J. Med. Entomol.* 1979. 15, 307–417.

**Ito H, Watanabe S, Takada A, Kawaoka Y.** Ebola virus glycoprotein: proteolytic processing, acylation, cell tropism, and detection of neutralizing antibodies. *J Virol.* 2001 Feb;75(3):1576-80.

**Jahrling PB, Geisbert TW, Dalgard DW, Johnson ED, Ksiazek TG, Hall WC, Peters CJ.** Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. *Lancet.* 1990 Mar 3;335(8688):502-5.

**Jasenosky LD, Kawaoka Y.** Filovirus budding. *Virus Res.* 2004 Dec;106(2):181-8. Review.

**Johnson KM, Lange JV, Webb PA, Murphy FA.** Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet.* 1977 Mar 12;1(8011):569-71.

**Johnson KM, McCormick JB, Webb PA, Smith ES, Elliott LH, and King IJ.** Clinical virology of Lassa fever in hospitalized patients. *J. Infect. Dis.* 1987 155: 456-464

**Jones SM, Feldmann H, Stroher U, Geisbert JB, Fernando L, Grolla A, Klenk HD, Sullivan NJ, Volchkov VE, Fritz EA, Daddario KM, Hensley LE, Jahrling PB, Geisbert TW.** Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nature Medicine* 2005; 11:786-90

**Joubert JR, King JB, Rossouw DJ, Cooper R.** A nosocomial outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever at Tygerberg Hospital. Part III. Clinical pathology and pathogenesis. *S Afr Med J.* 1985 Nov 9;68(10):722-8.

**Karti SS, Odabasi Z, Korten V, Yilmaz M, Sonmez M, Caylan R, Akdogan E, Eren N, Koksai I, Ovali E, Erickson BR, Vincent MJ, Nichol ST, Comer JA, Rollin PE, Ksiazek TG.** Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. *Emerging infectious diseases* 2004; 10:1379-84

**Keenlyside RA, McCormick JB, Webb PA, Smith E, Elliott L, Johnson KM.** Case-control study of *Mastomys natalensis* and humans in Lassa virus-infected households in Sierra Leone. *Am J Trop Med Hyg* 1983;32: 829-37

**Klenk HD.** Filoviren in Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G. Medizinische Mikrobiologie 8. Auflage Urban-Fischer, München 2001

**Krähling V, Dolnik O, Kolesnikova L, Schmidt-Chanasit J, Jordan I, Sandig V, Günther S, Becker S.** Establishment of fruit bat cells (*Rousettus aegyptiacus*) as a model system for the investigation of filoviral infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Aug 24;4(8):e802.

**Kolesnikova L, Mühlberger E, Ryabchikova E, Becker S.** Ultrastructural organization of recombinant Marburg virus nucleoprotein: comparison with Marburg virus inclusions. *J Virol*. 2000 Apr;74(8):3899-904.

**Ksiazek TG.** Clinical, virologic, and immunologic follow-up of convalescent Ebola hemorrhagic fever patients and their household contacts, Kikwit, Democratic Republic of the Congo. Commission de Lutte contre les Epidémies à Kikwit. *J Infect Dis*. 1999 Feb;179 Suppl 1:S28-35.

**Lee HW, van der Groen G.** Hemorrhagic fever with renal syndrome. *Prog Med Virol*. 1989;36:62-102. Review.

**Leroy EM, Baize S, Lu CY, et al.** Diagnosis of Ebola haemorrhagic fever by RT-PCR in an epidemic setting. *J Med Virol* 2000 Apr;60(4):463-7

**Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, Yaba P, Delicat A, Paweska JT, Gonzalez JP, Swanepoel R.** Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 2005 Dec 1; 438:575-6

**Leroy EM, Souquière S, Rouquet P, Drevet D.** Re-emergence of ebola haemorrhagic fever in Gabon. *Lancet*. 2002 Feb 23;359(9307):712

**Leroy EM, Telfer P, Kumulungui B, Yaba P, Rouquet P, Roques P, Gonzalez JP, Ksiazek TG, Rollin PE, Nerrienet E.** A serological survey of Ebola virus infection in central African nonhuman primates. *J infect Dis*. 2004 Dec; 190: 1895-9

**Licata JM, Johnson RF, Han Z, Harty RN.** Contribution of ebola virus glycoprotein, nucleoprotein, and VP24 to budding of VP40 virus-like particles. *Journal of Virology* 2004; 78:7344-51

**Linthicum, K.J., Bailey, C.L.** Ecology of Crimean–Congo hemorrhagic fever. In: Sonenshine, D.E., Mather, T.N. (Eds.), *Ecological Dynamics of Tick-Borne Zoonoses*. Oxford University Press, New York, 1994. pp. 392–437.

**Lukashevich IS, Clegg JC, Sidibe K.** Lassa virus activity in Guinea: distribution of human antiviral antibody defined using enzyme-linked

immunosorbent assay with recombinant antigen. *J Med Virol.* 1993 Jul;40(3):210-7

**Mayer CF.** Epidemic hemorrhagic fever of the Far East or endemic hemorrhagic nephroso-nephritis; morphology and pathogenesis. *Lab Invest.* 1952;1(3):291-311.

**McCormick JB, King IJ, Webb PA, Johnson KM, O'Sullivan R, Smith ES, Trippel S, Tong TC.** A case-control study of the clinical diagnosis and course of Lassa fever. *J Infect Dis.* 1987 Mar;155(3):445-55.

**McCormick JB, King IJ, Webb PA, Scribner CL, Craven RB, Johnson KM, Elliott LH, Belmont-Williams R.** Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N Engl J Med.* 1986 Jan 2;314(1):20-6.

**McCormick JB, Webb PA, Krebs JW, Johnson KM, Smith ES., A** prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa Fever. *J infect Dis.* 1987 Mar; 155(3): 437-44

**Mitchell SW, McCormick JB.** Physicochemical inactivation of Lassa, Ebola, and Marburg viruses and effect on clinical laboratory analyses. *J Clin Microbiol.* 1984 Sep;20(3):486-9.

**Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Mégraud F.** Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol.* 1997 Apr;35(4):995-8.

**Morvan JM, Deubel V, Gounon P, Nakoune E, Barriere P, Murri S, Perpete O, Selekon B, Coudrier D, Gautier-Hion A, Colyn M, Volehkov V.** Identification of Ebola virus sequences present as RNA or DNA in organs of terrestrial small mammals of the Central African Republic. *Microbes and infection* 1999; 1:1193-201

**Mühlberger E, Lotfering B, Klenk HD, Becker S.** Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. *Journal of Virology* 1998; 72:8756-64

**Mühlberger E, Trommer S, Funke C, Volchkov V, Klenk HD, Becker S.** Termini of all mRNA species of Marburg virus: sequence and secondary structure. *Virology.* 1996 Sep 15;223(2):376-80.

**Mullis KB, Faloona FA.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50

**Ozkurt Z, Kiki I, Erol S, Erdem F, Yilmaz N, Parlak M, Gundogdu M, Tasyaran MA.** Crimean-Congo hemorrhagic fever in Eastern Turkey: clinical features, risk factors and efficacy of ribavirin therapy. *Journal of infection* 2005; 10:E-Pub ahead of print

**Panning M, Laue T, Olschlager S, Eickmann M, Becker S, Raith S, Courbot MC, Nilsson M, Gopal R, Lundkvist A, Caro A, Brown D, Meyer H, Lloyd G, Kummerer BM, Gunther S, Drosten C.** Diagnostic reverse-transcription polymerase chain reaction kit for filoviruses based on the strain collections of all European biosafety level 4 laboratories. *Journal of Infectious Diseases* 2007; 196:199-204

**Peters CJ, Buchmeier M, Rollin PE, Ksiazek TG.** Arenaviruses. *Fields Virology, Third Edition* 1996: 1521-44; ISBN: 0-7817-0253-4

**Peters CJ, Sanchez A, Rollin PE, Ksiazek TG, Murphy FA.** Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses. *Fields Virology, Third Edition* 1996; 1161-76; ISBN: 0-7817-0253-4

**Peters CJ, Zaki SR.** Role of the endothelium in viral hemorrhagic fevers. *Crit Care Med.* 2002 May;30(5 Suppl):S268-73. Review.

**Price ME, Fisher-Hoch SP, Craven RB, McCormick JB.** A prospective study of maternal and fetal outcome in acute Lassa fever infection during pregnancy. *BMJ.* 1988 Sep 3;297(6648):584-7.

**Reynard O, Borowiak M, Volchkova VA, Delpeut S, Mateo M, Volchkov VE.** Ebolavirus glycoprotein GP masks both its own epitopes and the presence of cellular surface proteins. *J Virol.* 2009 Sep;83(18):9596-601. Epub 2009 Jul 8.

**Richmond JK, Baglole DJ.** Lassa fever: Epidemiology, clinical features, and social consequences. *BMJ* 2003; 327: 1271-75

**Rowe AK, Bertolli J, Khan AS, Mukunu R, Muyembe-Tamfum JJ, Bressler D, Williams AJ, Peters CJ, Rodriguez L, Feldmann H, Nichol ST, Rollin PE, Saijo M, Georges-Courbot MC, Marianneau P, et al.** Development of recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever. *Clin Vaccine Immunol* 2007 Sep;14(9):1182-9

**Ryabchikova E, Kolesnikova L, Smolina M, Tkachev V, Pereboeva L, Baranova S, Grazhdantseva A, Rassadkin Y.** Ebola virus infection in guinea pigs: presumable role of granulomatous inflammation in pathogenesis. *Arch Virol.* 1996;141(5):909-21.

**Ryabchikova EI, Kolesnikova LV, Netesov SV.** Animal pathology of filoviral infections. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999;235:145-73.

**Saeed MF, Kolokoltsov AA, Freiberg AN, Holbrook MR, Davey RA.** Phosphoinositide-3 kinase-Akt pathway controls cellular entry of Ebola virus. *PLoS Pathog.* 2008 Aug 29;4(8):e1000141.

**Saijo M, Niikura M, Ikegami T, et al.** Laboratory diagnostic systems for Ebola and Marburg hemorrhagic fevers developed with recombinant proteins. *Clin Vaccine Immunol* 2006 Apr;13(4):444-51

**Sanchez A, Geisbert TW, Feldmann H.** Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses in *Fields Virology 5<sup>th</sup> Edition* 2007; 1409-1448. ISBN-10: 0781760607

**Sanchez A, Kiley MP, Holloway BP, Auperin DD.** Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus. *Virus Res.* 1993 Sep;29(3):215-40

**Sanchez AJ, Vincent MJ, Nichol ST.** Characterization of the glycoproteins of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of Virology* 2002; 76:7263-75

**Sanchez A, Rollin PE.** Complete genome sequence of an Ebola virus (Sudan species) responsible for a 2000 outbreak of human disease in Uganda. *Virus Res.* 2005 Oct;113(1):16-25.

**Sanchez A, Trappier SG, Mahy BW, Peters CJ, Nichol ST.** The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 16;93(8):3602-7

**Schmaljohn CS, Nichol ST.** Bunyaviridae in *Fields Virology 5<sup>th</sup> Edition* 2007; 1741-1789. ISBN-10: 0781760607

**Schmitz H** Arenaviren in **Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G.** Medizinische Mikrobiologie 8. Auflage *Urban-Fischer, München* 2001

**Seesod N, Lunderberg J, Hedrum A, Aslund L, Holder A, Thaithong S, Uhlén M.** Immunomagnetic purification to facilitate DNA diagnosis of *Plasmodium falciparum*. *J Clin Microbiol.* 1993 Oct;31(10):2715-9.

**Shepherd AJ, Swanepoel R, Cornel AJ, Mathee O.** Experimental studies on the replication and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in some African tick species. *Am J Trop Med Hyg.* 1989 Mar;40(3):326-31.

**Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA, Shepherd SP.** Comparison of methods for isolation and titration of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Clin Microbiol.* 1986 Oct;24(4):654-6.

**Shimojima M, Takada A, Ebihara H, Neumann G, Fujioka K, Irimura T, Jones S, Feldmann H, Kawaoka Y.** Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *J Virol.* 2006 Oct;80(20):10109-16.

**Strecker T, Eichler R, Ter Meulen J, Weissenhorn W, Klenk HD, Garten W, Lenz O.** Lassa Virus Z Protein Is a Matrix Protein Sufficient for the Release of Virus-Like Particles. *Journal of Virology* 2003; 10: 10700-10705

**Ströher U, West E, Bugany H, Klenk HD, Schnittler HJ, Feldmann H.** Infection and activation of monocytes by Marburg and Ebola viruses. *J Virol.* 2001 Nov;75(22):11025-33.



- Sullivan N, Yang ZY, Nabel GJ.** Ebola virus pathogenesis: implications for vaccines and therapies. *Journal of Virology* 2003; 77:9733-7
- Swanepoel R, Gill DE, Shepherd AJ, Leman PA, Mynhardt JH, Harvey S.** The clinical pathology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Reviews of infectious diseases* 1989; 4:794-800
- Swenson DL, Warfield KL, Negley DL, Schmaljohn A, Aman MJ, Bavari S.** Virus-like particles exhibit potential as a pan-filovirus vaccine for both Ebola and Marburg viral infections. *Vaccine* 2005; 23:3033-42
- Ter Meulen J, Lukashevich I, Sidibe K, Inapogui A, Marx M, Dorlemann A, et al.** Hunting of peridomestic rodents and consumption of their meat as possible risk factors for rodent-to-human transmission of Lassa virus in the Republic of Guinea. *Am J Trop Med Hyg* 1996;55; 661-6.
- Timen A, Marion P.G. Koopmans, Ann C.T.M. Vossen, Gerard J.J. van Doornum, Stephan Günther, Franchette van den Berkmortel, Kees M. Verduin, Sabine Dittrich, Petra Emmerich, Albert D.M.E. Osterhaus, Jaap T. van Dissel, Roel A. Coutinho** Response to Imported Case of Marburg Hemorrhagic Fever, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2009 August; 15(8): 1171–1175. doi: 10.3201/eid1508.090051
- Tomori O, Fabiyi A, Sorungbe A, Smith A, McCormick JB.** Viral hemorrhagic fever antibodies in Nigerian populations. *Am J Trop Med Hyg.* 1988 Mar;38(2):407-10
- Towner JS, Pourrut X, Albariño CG, Nkogue CN, Bird BH, Grard G, Ksiazek TG, Gonzalez JP, Nichol ST, Leroy EM.** Marburg virus infection detected in a common African bat. *PLoS One.* 2007 Aug 22;2(1):e764.
- Towner JS, Rollin PE, Bausch DG, et al.** Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome. *J Virol* 2004 Apr;78(8):4330-41
- Towner JS, Sealy TK, Khristova ML, Albariño CG, Conlan S, Reeder SA, Quan PL, Lipkin WI, Downing R, Tappero JW, Okware S, Lutwama J, Bakamutumaho B, Kayiwa J, Comer JA, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST.** Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *PLoS Pathog.* 2008 Nov;4(11): e1000212. Epub 2008 Nov 21.
- Yang ZY, Duckers HJ, Sullivan NJ, Sanchez A, Nabel EG, Nabel GJ.** Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury. *Nature Medicine* 2000; 6:886-9
- Van Eeden, P.J., Joubert, J.R., van de Wal, B.W., King, J.B., de Kock, A., Groenewald, J.H.** A nosocomial outbreak of Crimean–Congo haemorrhagic fever at Tygerberg Hospital. Part I. Clinical features. *S. Afr. Med. J.*, 1985, 68, 711–717.

**Vaporciyan AA, Ward PA.** The inflammatory response. In *Williams Hematology* 5. Edition New York: McGraw-Hill; 1995; 48-57

**Vieth S, Drosten C, Lenz O, Vincent M, Omilabu S, Hass M, Becker-Ziaja B, Ter Meulen J, Nichol ST, Schmitz H, Günther S.** RT-PCR assay for detection of Lassa virus and related Old World arenaviruses targeting the L gene. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2007; 12:1253-64

**Villinger F, Rollin PE, Brar SS, Chikkala NF, Winter J, Sundstrom JB, Zaki SR, Swanepoel R, Ansari AA, Peters CJ.** Markedly elevated levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-alpha, interleukin (IL)-2, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha associated with fatal Ebola virus infection. *J Infect Dis.* 1999 Feb;179 Suppl 1:S188-91.

**Volchkov VE, Becker S, Volchkova VA, Ternovoj VA, Kotov AN, Netesov SV, Klenk HD.** GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. *Virology.* 1995 Dec 20;214(2):421-30.

**Volchkov VE, Feldmann H, Volchkova VA, Klenk HD.** Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 12;95(10):5762-7

**Volchkov VE, Volchkova VA, Muhlberger E, Kolesnikova LV, Weik M, Dolnik O, Klenk HD.** Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science.* 2001 Mar 9;291(5510):1965-9. Epub 2001 Feb 1

**Weidmann M, Muhlberger E, Hufert FT.** Rapid detection protocol for filoviruses. *J Clin Virol* 2004 May;30(1):94-9

**Whitehouse CA0** Crimean–Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Research* 64 (2004) 145–160

**World Health Organization. WHO** Lassa fever, fact sheet N° 179. Geneva:WHO, 2000

**World Health Organization. WHO** Crimean-Congo haemorrhagic fever, Fact sheet N° 208. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs208/en/index.html>

**Yedidag EN, Koffron AJ, Mueller KH, Kaplan B, Kaufman DB, Fryer JP, Stuart FP, Abecassis M.** Acyclovir triphosphate inhibits the diagnostic polymerase chain reaction for cytomegalovirus. *Transplantation.* 1996 Jul 27;62(2):238-42.

# Lebenslauf

Jos Tilmann Wolf Gebhard

Geburtstag, -ort: 9. September 1979 in Ehringshausen, Deutschland

Staatsangehörigkeit: deutsch

## AUSBILDUNG

- |                            |   |
|----------------------------|---|
| <b>06/1999</b>             | Abitur an der Goethe Schule in Wetzlar  |
| <b>10/1999 - 09/2000</b>   | Zivildienst an der Friedrich Fröbel Schule für Praktisch Bildbare in Wetzlar    |
| <b>10/2000 - 09/2007</b>   | Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg<br>Gesamtnote: 2,0 |
| <b>01/2003 - 2008</b>      | Doktorarbeit am Institut für Virologie  |
| <b>05/2008 – 01/2009</b>   | Assistenzarzt am BWK-Hamburg, Abteilung Innere Medizin:                         |
| <b>01/2009 – 05/2010</b>   | Assistenzarzt in der Geriatrie Asklepios-Klinik Wandsbek                        |
| <b>05/2010 bis 06/2011</b> | Assistenzarzt in der Zentralen Notaufnahme AK Wandsbek                          |
| <b>06/2011 bis 11/2012</b> | Assistenzarzt in der Inneren Medizin, Intensivstation AK Wandsbek               |
| <b>12/2012 bis heute</b>   | Assistenzarzt in der Zentralen Notaufnahme AK Wandsbek                          |

## FREMDSPRACHEN

Englisch (gute Sprachkenntnisse)

Französisch (Grundkenntnisse)

Jos Gebhard

Marburg, Mai 2013

## Liste der Hochschullehrer:

Prof. Dr. Arnold, Prof. Dr. Aumüller , Prof. Dr. Barth, Prof. Dr. Dr. Basler, Prof. Dr. Baum, Prof. Dr. Bien, Prof. Dr. Becker, PD Dr. Beyer, Prof. Dr. Cetin, PD Dr. Christiansen, Prof. Dr. Garten, Prof. Dr. Gotzen, Prof. Dr. Gress, Prof. Dr. Hertl, PD Dr. Hellinger, Prof. Dr. Geus, PD Dr. Grimm, Prof. Dr. Gudermann, PD Dr. Höffken, Prof. Dr. Hoffmann, Prof. Dr. Hoyer, PD. Dr. Herzum, PD Dr. Kalinowski, Prof. Dr. Kann, Prof. Dr. Kern, Prof. Dr. Klenk, Prof. Dr. Klose, prof. Dr. Kretschmer, Prof. Dr. Kroll, Prof. Dr. Köhler, PD Dr. Uwe Kuhlmann, Prof. Dr. Michael Lohoff, Prof. Dr. Maisch, Prof. Dr. Meier, Prof. Dr. Moll, Prof. Dr. Moosdorf, Prof. Dr. Mutters, Prof. Dr. Müller, Prof. Dr. Neubauer, Prof. Dr. Oertel, Prof. Dr. Dr. Remschmid, Prof. Dr. Renz, Prof. Dr. Richter, Prof. Dr. Rothmund, Prof. Dr. Schäfer, Prof. Dr. Schmidt, PD Dr. Schnabel, Prof. Dr. Schneider, Prof. Dr. Seybarth, Prof. Dr. Steininger, Prof. Dr. Vogelmeier, Prof. Dr. Wagner, Prof. Dr. Weihe, Prof. Dr. Werner, Prof. Dr. Wulf, PD Dr. Zielke,

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Dr. Stephan Becker danken, da er mich nach meiner an ihn gerichteten Bewerbung für eine Dissertation am Marburger Institut für Virologie an Dr. Markus Eickmann vermittelt hatte. Eine fachlich und menschlich bessere Betreuung als bei ihm hätte ich mir nicht wünschen können – ohne ihn wäre die Fertigstellung dieser Arbeit in vielerlei Hinsicht nicht möglich gewesen. Gleiches gilt für Ina Kraus, Jens Kursawe, Melanie Gössl, Dorothea Gicklhorn, Ivan Kurolt und Miriam Hock, die immer für Fragen zur Verfügung standen und mit ihrer offenen Art und ihrem Humor die Arbeit im Labor maximal angenehm gestalteten. Mein Dank gilt natürlich auch Prof. Dr. Wolfgang Garten für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Einen ganz besonderen Dank richte ich an meine Eltern, die mich bestmöglich auf ein Universitätsstudium vorbereitet hatten und während des Medizinstudiums und der Dissertation großartig unterstützten und auch finanzierten.

Meinen Freunden Robin Schmidt, Marten Hornbostel, Darwin Schneider, Heiko Kludt, Markus Rose, Mareike Brecht, Tim Pippart, Katrin Brömse u.a. danke ich für die beständige Erinnerung daran, dass es ein Leben neben der Uni gibt. Für den jederzeit angebotenen fachlichen Rat danke ich Wiki P. Dia und dem Pub Med für seine durchgehenden Öffnungszeiten. Zum Schluss möchte ich meiner Freundin Claudia Allonas danken, da sie erheblich dazu beigetragen hat, dass diese Arbeit letztendlich abgeschlossen und eingereicht wurde und zudem sehr beim Layouten und dem Kampf mit den Verzeichnissfunktionen von Word geholfen hat.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

### **„RT-PCR Diagnostik von nosokomial übertragbaren Hämorrhagischen Fieber Viren“**

im Medizinischen Zentrum für Hygiene und Infektionsbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk mit Unterstützung von Dr. Markus Eickmann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hamburg, Mai 2013

Jos Gebhard